

Lokalisation und Expression von Komponenten des cholinergen Systems im unbehandelten und entzündeten Hoden der Ratte

Iris Veronica Bianca Eckhardt

INAUGURALDISSERTATION zur Erlangung des Grades eines **Doktors der Medizin**
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2013

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2013

© 2013 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen

Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

**Lokalisation und Expression von Komponenten
des cholinergen Systems im unbehandelten
und entzündeten Hoden der Ratte**

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Iris Veronica Bianca Eckhardt
aus Nürnberg

Gießen 2012

Aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. W. Kummer
AG Reproduktionsbiologie (Prof. Dr. A. Meinhardt)

Gutachter: Prof. Dr. Andreas Meinhardt
Gutachter: Prof. Dr. Martin Bergmann

Tag der Disputation: 21.10.2013

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Abkürzungsverzeichnis.....	V
Abbildungsverzeichnis.....	VIII
Tabellenverzeichnis	XII
1. Einleitung	1
1.1 Hoden.....	1
1.1.1 Aufbau und Funktion des Hodens.....	1
1.1.1.1 Keimepithel und Spermatogenese	4
1.1.1.2 Interstitium.....	6
1.1.2 Immunologie des Hodens	7
1.1.3 Orchitis	8
1.1.4 Innervation des Hodens.....	9
1.2 Acetylcholin	12
1.2.1 Das neuronale cholinerge System	12
1.2.1.1 Komponenten des neuronalen cholinergen Systems	13
1.2.2 Das non-neuronale cholinerge System	18
1.2.2.1 Komponenten des non-neuronalen cholinergen Systems	20
1.2.2.2 Pathophysiologische Rolle des non-neuronalen cholinergen Systems in entzündlich verändertem Gewebe	22
1.3 Zielsetzung der Arbeit.....	23
2. Material und Methoden.....	24
2.1 Material.....	24
2.1.1 Chemikalien und Reagenzien.....	24
2.1.2 Geräte.....	25
2.1.3 Puffer und Lösungen.....	26
2.1.4 Versuchsmaterial.....	28
2.1.5 Kits	28
2.1.6 Primer	28

2.1.7	Antikörper (Immunfluoreszenz)	31
2.1.8	Zellen	31
2.1.9	Versuchstiere	32
2.2	Methoden.....	34
2.2.1	Molekularbiologische Methoden	34
2.2.1.1	Gewebematerial.....	34
2.2.1.2	RNA-Isolierung	35
2.2.1.3	Spektralphotometrische Quantifizierung der isolierten RNA.....	36
2.2.1.4	RNA-Gelelektrophorese	37
2.2.1.5	DNase-Verdau	37
2.2.1.6	Reverse-Transkription	39
2.2.1.7	Qualitative PCR.....	39
2.2.1.8	DNA-Agarose-Gelelektrophorese	41
2.2.1.9	Co-Reverse-Transkription	42
2.2.1.10	Quantitative RealTime-PCR.....	42
2.2.2	Morphologische Methoden.....	45
2.2.2.1	Gewebematerial.....	45
2.2.2.2	Herstellung von Kryostatschnitten	45
2.2.2.3	Immunfluoreszenz	45
3.	Ergebnisse	48
3.1	ChAT im Hoden der Ratte	48
3.1.1	Nachweis von ChAT in testikulären Zellen	48
3.1.2	Immunfluoreszenzmikroskopischer Nachweis von ChAT	49
3.1.3	Vergleich der ChAT mRNA Expression in EAO- und Adjuvans-Kontrolltieren	52
3.2	ChT1 im Hoden der Ratte.....	54
3.2.1	Nachweis von ChT1 in testikulären Zellen	54
3.2.2	Immunfluoreszenzmikroskopischer Nachweis von ChT1	56

3.2.3	Vergleich der ChT1 mRNA Expression in EAO- und Adjuvans-Kontrolltieren	59
3.3	VACHT im Hoden der Ratte	61
3.3.1	Nachweis von VACHT in testikulären Zellen	61
3.3.2	Immunfluoreszenzmikroskopischer Nachweis von VACHT	63
3.3.3	Vergleich der VACHT mRNA Expression in EAO- und Adjuvans-Kontrolltieren	65
3.4	OCT2 im Hoden der Ratte	66
3.4.1	Nachweis von OCT2 in testikulären Zellen	66
3.4.2	Immunfluoreszenzmikroskopischer Nachweis von OCT2	68
3.4.3	Vergleich der OCT2 mRNA Expression in EAO- und Adjuvans-Kontrolltieren	71
3.5	OCT3 im Hoden der Ratte	72
3.5.1	Nachweis von OCT3 in testikulären Zellen	72
3.5.2	Immunfluoreszenzmikroskopischer Nachweis von OCT3	74
3.5.3	Vergleich der OCT3 mRNA Expression in EAO- und Adjuvans-Kontrolltieren	76
3.6	nAChR α 7-Untereinheit im Hoden der Ratte	76
3.6.1	Nachweis der nAChR α 7-Untereinheit in testikulären Zellen	76
3.6.2	Vergleich der nAChR α 7-Untereinheit mRNA Expression in EAO- und Adjuvans-Kontrolltieren	78
3.7	nAChR α 4-Untereinheit im Hoden der Ratte	79
3.7.1	Nachweis der nAChR α 4-Untereinheit in testikulären Zellen	79
3.7.2	Vergleich der nAChR α 4-Untereinheit mRNA Expression in EAO- und Adjuvans-Kontrolltieren	81
4.	Diskussion	83
4.1	Nachweis der molekularen Komponenten des non-neuronalen cholinergen Systems in den männlichen Geschlechtsorganen	83
4.2	Funktion und Bedeutung des non-neuronalen cholinergen Systems im Hoden	86

4.2.1	Proliferation und Differenzierung von Keimzellen	86
4.2.2	Spermato- und Spermiogenese	88
4.2.3	Gap Junctions.....	89
4.2.4	Spermienmotilität.....	91
4.2.5	Akrosomenreaktion.....	93
4.3	Spezifische Rollen einzelner molekularer Komponenten des non-neuronalen cholinergen Systems in den männlichen Geschlechtsorganen.....	95
4.3.1	Einfluss nikotinischer Rezeptoren auf die Fertilität	95
4.3.2	Stadienspezifische Expression des hochaffinen Cholintransporters-1	96
4.3.3	Geschlechtsspezifität der organischen Kationentransporter	97
4.4	Expression von Acetylcholin im Rahmen der experimentell ausgelösten Autoimmunorchitis - Problematik der Standardabweichung und Signifikanz	99
4.5	Vorkommen und Rolle von Acetylcholin in anderen inflammatorischen oder autoimmunologisch bedingten Erkrankungen	100
5.	Zusammenfassung	105
6.	Summary	106
	Literaturverzeichnis	XIII
	Anhang.....	XXIX
A.	Danksagungen	XXIX
B.	Eigene Veröffentlichungen.....	XXXI
C.	Ehrenwörtliche Erklärung.....	XXXII

Abkürzungsverzeichnis

ACh	Acetylcholin
AChE	Acetylcholinesterase
AS	Aminosäure(n)
ADJ	Adjuvans
bp	Basenpaar
BSA	bovines Serumalbumin
BuChE	Butyrylcholinesterase
b.w.	body weight
°C	Grad Celsius
CarAT	Carnitinacetyltransferase
ChAT	Cholinacetyltransferase
cDNA	complementary DNA (komplementäre DNS)
ChT	Cholintransporter
CoA	Coenzym A
CPON	C-terminal accompanying peptide of neuropeptide Y
Ct	cycle threshold
d	days (Tage)
DAPI	4', 6'-Diamidino-2-phenylindol
DBH	Dopamin-beta-Hydroxylase
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleic acid (DNS: Desoxyribonukleinsäure)
DNase	Deoxyribonuklease
dNTPs	2'-Desoxynukleosid-5'-Triphosphate
DTT	Dithiothreitol
EAO	Experimental autoimmune orchitis (experimentelle Autoimmunorchitis)
EDTA	Ethylene diamine tetraacetic acid (Ethylendiamintetraessigsäure)

FCS	fetal calf serum (fetales Kälberserum)
FSH	Follikel-stimulierendes Hormon
g	Gramm
GAPDH	Glycerin-Aldehyd-Phosphat-Dehydrogenase
HPLC	High-performance liquid chromatography (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie)
5-HT	5-Hydroxytryptamin
Ig	Immunglobulin
kb	Kilo-Basen
kD	Kilo-Dalton
KG	Körpergewicht
l	Liter
L	links
LH	luteinisierendes Hormon
Lsg	Lösung
M	Molar
mAChR	muskarinischer Acetylcholinrezeptor
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	millimolar
M-MLV RT	Maus Moloney-Leukämie-Virus Reverse Transkriptase
mw	molecular weight
nAChR	nikotinischer Acetylcholinrezeptor
NHS	normal horse serum (normales Pferdeserum)
NPY	Neuropeptid Y
NSE	Neuronenspezifische Enolase
NSS	normales Schweineserum
OCT	organic cation transporter (organischer Kationentransporter)

OD	optische Dichte
PBS	Phosphate buffered saline (phosphatgepufferte Salzlösung)
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
PFA	Paraformaldehyd
PGP	protein gene product
PHA	Phytohemagglutinin
PP	Phosphatpuffer
R	rechts
RNA	Ribonucleic acid (RNS: Ribonukleinsäure)
RNase	Ribonuklease
rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT	Reverse Transkription
RT-PCR	Reverse-Transkription-PCR
TAE	Tris-Acetat-EDTA Puffer
TE	Tris-EDTA
Tris	Tris(hydroxymethyl)-amino-methan
sec	seconds (Sekunden)
U	Unit (Einheit)
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	volume per volume (Volumen pro Volumen)
VAChT	Vesikulärer Acetylcholintransporter
VIP	vasoaktives intestinales Polypeptid
Vol	Volumen
w/v	weight per volume (Gewicht pro Volumen)
μ	Mikro
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μM	Mikromolar

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1-1: Keimepithel des Hodens.....	3
Abb. 1-2: Keimepithel (Hoden, Mensch).....	5
Abb. 1-3: Die 14 Spermatogenesestadien der Ratte	6
Abb. 1-4: Schematische Darstellung des cholinergen Genlocus.. ..	15
Abb. 1-5: Synthese, Freisetzung und Recycling von ACh anhand einer cholinergen Zelle.. .	18
Abb. 2-1: RNA-Gelelektrophorese testikulärer Zellen.....	32
Abb. 3-1: Qualitativer Nachweis der ChAT mRNA Expression mittels RT-PCR-Analyse in verschiedenen isolierten Zellen des Hodens der Ratte	48
Abb. 3-2: Semiquantitativer Nachweis der ChAT mRNA Expression in verschiedenen isolierten Zellen des Hodens der Ratte	49
Abb. 3-3: Immunfluoreszenzmikroskopischer Nachweis von ChAT in der Trachea der Ratte als Positivkontrolle	49
Abb. 3-4: Immunfluoreszenzmikroskopischer Nachweis von ChAT im Hoden von unbehandelten (CTR), EAO- und Adjuvans-Kontrolltieren (ADJ) 50 und 80 Tage (d) nach Behandlung.....	50
Abb. 3-5: Immunfluoreszenzmikroskopischer Nachweis von ChAT im Hoden von ADJ- Kontrolltieren 80 Tage nach Behandlung.....	51
Abb. 3-6: Immunfluoreszenzmikroskopischer Nachweis von ChAT in EAO-Hoden 80 Tage nach Behandlung.....	52
Abb. 3-7: Qualitativer Nachweis der ChAT mRNA Expression mittels RT-PCR-Analyse im Hoden von unbehandelten (CTR), EAO- und Adjuvans-Kontrolltieren (ADJ) 50 und 80 Tage (d) nach Behandlung	53
Abb. 3-8: Nachweis der ChAT mRNA Expression mittels qRT-PCR-Analyse im Hoden von unbehandelten (CTR), EAO- und Adjuvans-Kontrolltieren (ADJ) 50 und 80 Tage (d) nach Behandlung.....	53
Abb. 3-9: Qualitativer Nachweis der ChT1 mRNA Expression mittels RT-PCR-Analyse in verschiedenen isolierten Zellen des Hodens der Ratte	55

Abb. 3-10: Semiquantitativer Nachweis der ChT1 mRNA Expression in verschiedenen isolierten Zellen des Hodens der Ratte	55
Abb. 3-11: Immunfluoreszenzmikroskopischer Nachweis von ChT1 in der Trachea der Ratte als Positivkontrolle	56
Abb. 3-12: Immunfluoreszenzmikroskopischer Nachweis von ChT1 im Hoden von unbehandelten (CTR), EAO- und Adjuvans-Kontrolltieren (ADJ) 50 und 80 Tage (d) nach Behandlung.....	57
Abb. 3-13: Immunfluoreszenzmikroskopischer Nachweis von ChT1 im Hoden von Orchitistieren 80 Tage nach Behandlung	58
Abb. 3-14: Immunfluoreszenzmikroskopischer Nachweis von ChT1 im unbehandelten Hoden der Ratte.....	59
Abb. 3-15: Qualitativer Nachweis der ChT1 mRNA Expression mittels RT-PCR-Analyse im Hoden von EAO- und Adjuvans-Kontrolltieren (ADJ) 50 und 80 Tage (d) nach Behandlung.....	60
Abb. 3-16: Nachweis der ChT1 mRNA Expression mittels qRT-PCR-Analyse im Hoden von unbehandelten (CTR), EAO- und Adjuvans-Kontrolltieren (ADJ) 50 und 80 Tage (d) nach Behandlung.....	60
Abb. 3-17: Qualitativer Nachweis der VACHT mRNA Expression mittels RT-PCR-Analyse in verschiedenen isolierten Zellen des Hodens der Ratte	62
Abb. 3-18: Semiquantitativer Nachweis der VACHT mRNA Expression in verschiedenen isolierten Zellen des Hodens der Ratte	62
Abb. 3-19: Immunfluoreszenzmikroskopischer Nachweis von VACHT in der Trachea der Ratte als Positivkontrolle	63
Abb. 3-20: Immunfluoreszenzmikroskopischer Nachweis von VACHT im Hoden von unbehandelten (CTR), EAO- und Adjuvans-Kontrolltieren (ADJ) 50 und 80 Tage (d) nach Behandlung.....	64
Abb. 3-21: Qualitativer Nachweis der VACHT mRNA Expression mittels RT-PCR-Analyse im Hoden von EAO- und Adjuvans-Kontrolltieren (ADJ) 50 und 80 Tage (d) nach Behandlung.....	65

Abb. 3-22: Nachweis der VACHT mRNA Expression mittels qRT-PCR-Analyse im Hoden von unbehandelten (CTR), in EAO- und Adjuvans-Kontrolltieren (ADJ) 50 und 80 Tage (d) nach Behandlung.	66
Abb. 3-23: Qualitativer Nachweis der OCT2 mRNA Expression mittels RT-PCR-Analyse in verschiedenen isolierten Zellen des Hodens der Ratte	67
Abb. 3-24: Semiquantitativer Nachweis der OCT2 mRNA Expression in verschiedenen isolierten Zellen des Hodens der Ratte	68
Abb. 3-25: Immunfluoreszenzmikroskopischer Nachweis von OCT2 in der Trachea der Ratte als Positivkontrolle	69
Abb. 3-26: Immunfluoreszenzmikroskopischer Nachweis von OCT2 im Hoden von unbehandelten (CTR), EAO- und Adjuvans-Kontrolltieren (ADJ) 50 und 80 Tage (d) nach Behandlung.....	70
Abb. 3-27: Qualitativer Nachweis der OCT2 mRNA Expression mittels RT-PCR-Analyse im Hoden von EAO- und Adjuvans-Kontrolltieren (ADJ) 50 und 80 Tage (d) nach Behandlung.....	71
Abb. 3-28: Nachweis der OCT2 mRNA Expression mittels qRT-PCR-Analyse im Hoden von unbehandelten (CTR), in EAO- und Adjuvans-Kontrolltieren (ADJ) 50 und 80 Tage (d) nach Behandlung.	72
Abb. 3-29: Qualitativer Nachweis der OCT3 mRNA Expression mittels RT-PCR-Analyse in verschiedenen isolierten Zellen des Hodens der Ratte	73
Abb. 3-30: Semiquantitativer Nachweis der OCT3 mRNA Expression in verschiedenen isolierten Zellen des Hodens der Ratte.	73
Abb. 3-31: Immunfluoreszenzmikroskopischer Nachweis von OCT3 in der Trachea der Ratte als Positivkontrolle	74
Abb. 3-32: Immunfluoreszenzmikroskopischer Nachweis von OCT3 im Hoden von unbehandelten, EAO- und Adjuvans-Kontrolltieren (ADJ) 50 und 80 Tage (d) nach Behandlung.....	75
Abb. 3-33: Qualitativer Nachweis der OCT3 mRNA Expression mittels RT-PCR-Analyse in EAO- und Adjuvans-Kontrolltieren (ADJ) 50 und 80 Tage (d) nach Behandlung.....	76

Abb. 3-34: Qualitativer Nachweis der nAChR α 7-Untereinheit mRNA Expression mittels RT-PCR-Analyse in verschiedenen isolierten Zellen des Hodens der Ratte	77
Abb. 3-35: Semiquantitativer Nachweis der nAChR α 7-Untereinheit mRNA Expression in verschiedenen isolierten Zellen des Hodens der Ratte	77
Abb. 3-36: Qualitativer Nachweis der nAChR α 7-Untereinheit mRNA Expression mittels RT-PCR-Analyse in EAO- und Adjuvans-Kontrolltieren (ADJ) 50 und 80 Tage (d) nach Behandlung.....	78
Abb. 3-37: Nachweis der nAChR α 7 mRNA Expression mittels qRT-PCR-Analyse im Hoden von unbehandelten (CTR), EAO- und Adjuvans-Kontrolltieren (ADJ) 50 und 80 Tage (d) nach Behandlung.	79
Abb. 3-38: Qualitativer Nachweis der nAChR α 4-Untereinheit mRNA Expression mittels RT-PCR-Analyse in verschiedenen isolierten Zellen des Hodens der Ratte	80
Abb. 3-39: Semiquantitativer Nachweis der nAChR α 4-Untereinheit mRNA Expression in verschiedenen isolierten Zellen des Hodens der Ratte	80
Abb. 3-40: Qualitativer Nachweis der nAChR α 4-Untereinheit mRNA Expression mittels RT-PCR-Analyse in EAO- und Adjuvans-Kontrolltieren (ADJ) 50 und 80 Tage (d) nach Behandlung.....	81
Abb. 3-41: Nachweis der nAChR α 4-Untereinheit mRNA Expression mittels qRT-PCR-Analyse im Hoden von unbehandelten (CTR), EAO- und Adjuvans-Kontrolltieren (ADJ) 50 und 80 Tage (d) nach Behandlung.....	82

Tabellenverzeichnis

Tab. 1-1: Humanes non-neuronales Gewebe, in welchem ACh mithilfe von HPLC oder ChAT mittels Immunhistologie nachgewiesen wurde.....	19
Tab. 1-2: Non-neuronales Gewebe der Ratte, in welchem ACh mithilfe der HPLC nachgewiesen wurde	20
Tab. 2-1: Übersicht der für die RT-PCR verwendeten Primerpaare.....	30
Tab. 2-2: Übersicht der verwendeten Versuchstiere mit Adjuvansbehandlung (ADJ) und EAO	34
Tab. 2-3: Zusammensetzung der Proben für die DNase-BehandlungI	38
Tab. 2-4: Zusammensetzung der Proben für die DNase-BehandlungII.....	38
Tab. 2-5: Zusammensetzung des Ansatzes für die reverse Transkription.....	39
Tab. 2-6: Zusammensetzung eines einfachen Ansatzes für die qualitative PCR-Analyse in verschiedenen isolierten Zellen des Hodens der Ratte.	40
Tab. 2-7: Zusammensetzung eines einfachen Ansatzes für die RT-PCR-Analyse in EAO- und Adjuvans-Kontrolltieren 50 und 80 Tage nach Behandlung	40
Tab. 2-8: Temperatur- und Zeitprofil der RT-PCR-Programme.....	41
Tab. 2-9: Zusammensetzung eines einfachen Ansatzes für die RealTime-qRT-PCR-Analyse.	43

1. Einleitung

1.1 Hoden

Die paarigen Hoden bilden zusammen mit den Nebenhoden, Samenleitern und den Geschlechtsdrüsen das innere männliche Genitale. Das äußere Genitale besteht aus Penis und Hodensack, dem *Scrotum*. Hoden und Nebenhoden befinden sich zusammen im *Scrotum*. Zu den Hodenhüllen gehören innen die *Tunica albuginea*, nach außen das anliegende *Epidiorchium* und das daraufliegende *Periorchium*, welche zusammen die *Tunica vaginalis testis* bilden. Das so genannte *Mesorchium* stellt die Anheftungsstelle des Samenstrangs dorsal am Hoden dar. Nach außen folgen dann die *Fascia spermatica interna* und *externa* mit dem dazwischenliegenden *Musculus cremaster*.

Während der Fetalzeit wandert der Hoden aus der Bauchhöhle in das *Scrotum* und zieht den Samenstrang mit den *Aa. testiculares*, dem venösen *Plexus pampiniformis* und dem *Ductus deferens* mit sich (Holstein, 2003).

1.1.1 Aufbau und Funktion des Hodens

Bei einer Länge von 40-45 mm und einem Durchmesser von 30 mm hat der adulte menschliche Hoden ein Volumen von 20-25 ml. Die Konsistenz ist dabei prall-elastisch. Die derbe, bindegewebige Kapsel (*Tunica albuginea*) gibt dem Hoden mit ihren vielen glatten Muskelzellen Form und Halt. Das Innere des Hodens durchziehen bindegewebige Septen, in denen auch Blutgefäße und Nerven verlaufen, und bilden so mehrere Hundert Hodenläppchen, die *Lobuli testis* (Holstein, 2003). Diese stellen das eigentliche Hodenparenchym dar und enthalten pro Läppchen zwei bis vier Samenkanälchen (*Tubuli seminiferi contorti*), bestehend aus dem Keimepithel und einer myofibrösen Hülle (*Lamina propria*). Diese Lamina ist aus einer Basalmembran, einer Kollagenfaserschicht und den peritubulären Zellen aufgebaut. Letztere umgeben die Tubuli konzentrisch, beim Menschen in sechs und mehr, beim Säugetierhoden in zwei bis vier Lagen, bei Nagern mit nur einer Lage. Mithilfe von Glattmuskel-Aktin können sich die peritubulären Zellen periodisch zusammenziehen und somit eine peristaltische Kontraktion des Samenkanälchens auslösen,

wodurch der Transport der Spermien zu den Ausführungsgängen hin erfolgt. Dieser Vorgang wird vermutlich durch das Hormon Oxytocin reguliert (Weinbauer et al., 2000). Von dort werden die Spermien entweder über *Tubuli recti* oder direkt in das *Rete testis* und schließlich über *Ductuli efferentes* in den Nebenhodengang weitergeleitet (Holstein, 2003). Zwischen den Samenkanälchen befindet sich das Interstitium mit den Testosteron produzierenden Leydig-Zellen. Damit erfüllt der Hoden sowohl reproduktive als auch endokrine Funktion (Welsch, 2006).

Das Keimepithel besteht aus speziellen Stützzellen, so genannten Sertoli-Zellen, und den Keimzellen (Holstein, 2003). Bei den Sertoli-Zellen handelt es sich um somatische Zellen, welche sowohl für die Hodengröße als auch das Ausmaß der Spermienproduktion verantwortlich sind (Weinbauer et al., 2000). Sie reichen von der Basallamina bis zum Lumen der Samenkanälchen und sind in Kontakt mit allen Keimzellen (Holstein, 2003). Da jede einzelne Sertoli-Zelle je nach Spezies mit einer gewissen Zahl an Spermatiden in Verbindung steht (Mensch: 4, Ratte: 10) wird die Zahl der produzierten Spermien von der Anzahl funktionstüchtiger Sertoli-Zellen determiniert (Weinbauer et al., 2000). Benachbarte Sertoli-Zellen sind über spezielle Zellkontakte, *Zonulae occludentes*, verbunden, wodurch das Keimepithel in ein basales und ein luminales Kompartiment unterteilt wird. Basal befinden sich Spermatogonien und Spermatozyten I im Präleptotänstadium, luminal die übrigen Spermatozyten I, Spermatozyten II und Spermatiden. Die durch diese Zellkontakte entstandene Barriere wird als Blut-Hoden-Schranke bezeichnet. Sie bewirkt einen gezielten Stofftransport nach luminal, was dem Schutz der Spermatiden vor mutagenen Substanzen dient (Holstein, 2003; Welsch, 2006). Des Weiteren wird durch die physikalische Isolierung der haploiden und somit antigenen Keimzellen eine Erkennung durch das Immunsystem verhindert und damit einer möglichen Autoimmunorchitis vorgebeugt (Weinbauer et al., 2000). Das spezielle Milieu, welches durch die Ausbildung der Blut-Hoden-Schranke entsteht, ist notwendig für die Meiose sowie die weitere Entwicklung der Keimzellen. Zellen im luminalen Bereich können durch die Blut-Hoden-Schranke nicht direkt, sondern nur indirekt durch die Sertoli-Zellen ernährt werden (Weinbauer et al., 2000). Eine von den Sertoli-Zellen produzierte und sezernierte Flüssigkeit öffnet und füllt das Tubuluslumen

1.1.1.1 Keimepithel und Spermatogenese

Die Keimzellen vermehren sich und reifen zu Samenzellen heran, was als *Spermatogenese* bezeichnet wird. Dabei entwickeln sich ausgehend von den außen an der Basalmembran liegenden Spermatogonien, über primäre und sekundäre Spermatozyten, schließlich Spermatiden am Lumen des Samenkanälchens. Innerhalb der Spermatogonien lassen sich zwei Gruppen unterscheiden. So gelten Typ A-Spermatogonien als Stammzellen, welche sich mitotisch teilen. Eine der Tochterzellen bleibt A-Spermatogonie und differenziert sich nicht weiter, die andere wird zur Typ B-Spermatogonie, welche bereits einen weiterentwickelten Zelltyp darstellt (Welsch, 2006). Durch deren mitotische Teilung entstehen primäre (präleptotäne) Spermatozyten mit diploidem Chromosomensatz und doppeltem DNA-Gehalt ($46\text{ XY}, 2n\ 4C\text{ DNA}$), welche anschließend die Meiose I (1. Reifeteilung) durchlaufen. Entsprechend der einzelnen Stadien der Prophase der Meiose lassen sich die Spermatozyten unterscheiden. In diesen Stadien (Leptotän, Zygotän, Pachytän, Diplotän und Diakinese) weisen die Zellkerne ein unterschiedliches Aussehen des Chromatins auf. Am Ende der ersten meiotischen Teilung liegen sekundäre Spermatozyten mit haploidem Chromosomensatz, aber ohne vollständige Trennung der Chromatiden vor ($23\text{ X oder Y}, 1n\ 2C\text{ DNA}$). Diese sind sehr kurzlebig und somit selten im mikroskopischen Präparat sichtbar, weil sie ihre DNA nicht mehr verdoppeln, sondern relativ schnell in die Meiose II (2. Reifeteilung) eintreten. Aus ihnen gehen haploide Spermatiden mit voneinander getrennten Chromatiden hervor ($23\text{ X oder Y}, 1n\ 1C\text{ DNA}$) (Welsch, 2006; Bergmann, 2011). Im Rahmen der *Spermiogenese* entstehen aus runden Spermatiden ausdifferenzierte, elongierte Spermatiden (Spermien). Dabei finden keine Teilungen, sondern phasisch gegliedert (Golgi-, Kappen-, Akrosom-, Reifungsphase) nur noch Differenzierungsprozesse statt. Während der *Spermiation* werden elongierte Spermatiden in das Lumen entlassen (Weinbauer et al., 2000).

Bei Betrachtung der Samenkanälchen im Querschnitt zeigen sich entsprechend der verschiedenen Differenzierungsschritte der Keimzellen sogenannte Stadien der *Spermatogenese*. Diese sind abhängig von der Spermatidenreifung nummeriert. Ein Zyklus bezeichnet das Durchlaufen aller Stadien der *Spermatogenese* an einer bestimmten Stelle des Keimepithels (Bergmann, 2011).

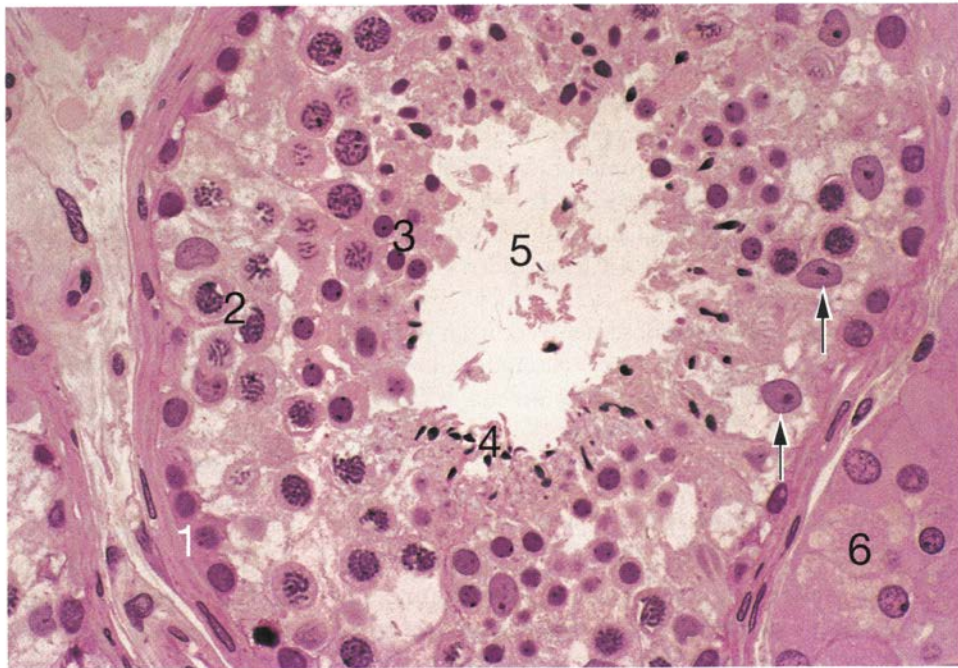


Abb. 1-2: Keimepithel (Hoden, Mensch), Ausschnitt. 1 deutlich erkennbare Spermatogonien; 2 Spermatozyten 1. Ordnung; 3 frühe Spermatiden; 4 späte Spermatiden; → Sertoli-Zellen; 5 Lumen; 6 Leydig-Zellen. Plastikschnitt; Färbung H.E.; Vergrößerung 450fach (aus Welsch, 2006).

Die Dauer eines *Spermatogenese-Zyklus* variiert erheblich; je nach Tierart zwischen 8 und 12,5 Tagen, beim Menschen sogar 16 Tage. Für die Entwicklung von einer Spermatogonie zum reifen Spermium müssen mindestens vier solcher Zyklen durchlaufen werden. So ergeben sich für die Gesamtdauer der *Spermatogenese* 51-53 Tage bei Ratten und mehr als 64 Tage beim Mann. Auch die Anzahl der *Spermatogenesestadien* unterscheidet sich von Spezies zu Spezies. So können beim Mann sechs verschiedene Stadien, bei der Ratte hingegen 14 Stadien charakterisiert werden (Weinbauer et al., 2000). Beim Menschen findet sich ein sogenanntes multi-stage-arrangement, d.h. innerhalb eines Tubulusquerschnitts können mehrere Spermatogenesestadien nebeneinander differenziert werden (Johnson, 1994; Johnson et al., 1996).

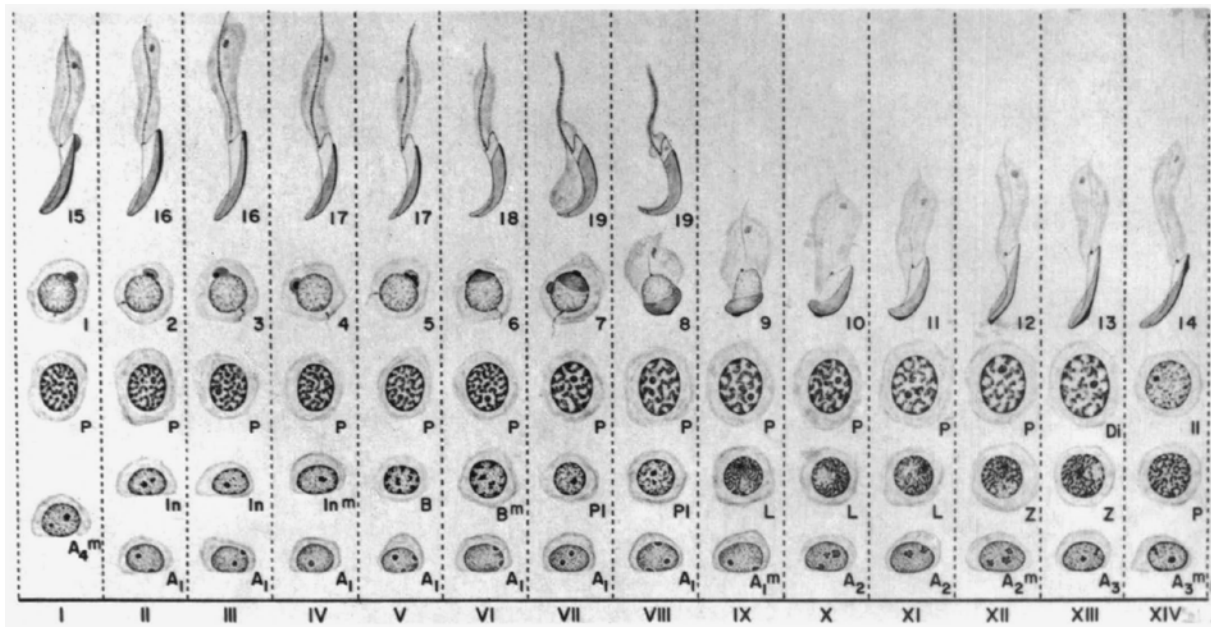


Abb. 1-3: Die 14 Spermatogenesestadien der Ratte (I-XIV). A: A-Spermatogonien. In: Intermediär-Spermatogonien. B: B-Spermatogonien. Pl: Präleptotän-Spermatozyten. L: Leptotän-Spermatozyten. Z: Zygotän-Spermatozyten. P: Pachytän-Spermatozyten. Di: Diplotän-Spermatozyten. II: sekundäre Spermatozyten. 1-19: Spermatiden in verschiedenen Differenzierungsabschnitten (aus Parvinen, 1982).

Weiterhin ist in der menschlichen Keimzellentwicklung auffällig, dass sie nur eine geringe Effizienz aufweist. Während sich bei der Ratte ungefähr doppelt so viele Sertoli-Zellen und korreliert auch wesentlich mehr Spermatiden finden, ist die Keimzellichte beim Menschen relativ gering. Hohe Verluste an Keimzellen in der Meiose u.a. durch Apoptose, führen dazu, dass anstelle von theoretisch vier runden Spermatiden im Schnitt meist nur zwei entstehen (Weinbauer et al., 2000).

1.1.1.2 Interstitium

Der intertubuläre Raum macht 2-6% des Hodenvolumens bei Labortieren und 12-15% beim Menschen aus (Weinbauer et al., 2000). Neben amorpher extrazellulärer Matrix, dem Kapillarsystem, Nerven, Lymphgefäßen, Makrophagen, vereinzelt Mastzellen und fibroblastenähnlichen Bindegewebszellen enthält er mit den endokrinen Leydig-Zellen auch gleichzeitig die größten Zellen in diesem Kompartiment. Diese werden besonders von Blutkapillaren umgeben. Leydig-Zellen bilden LH-gesteuert vor allem das wichtigste Androgen, das Testosteron, welches rasch in den intertubulären Raum und das Keimepithel diffundiert. Dort wirkt es auf die Sertoli-Zellen, welche die Keimzellbildung steuern.

Es werden immature und adulte Leydig-Zellen unterschieden. In adulten Leydig-Zellen finden sich vor allem Mitochondrien mit tubulären Cristae und glattes endoplasmatisches Retikulum, beides Merkmale einer Steroidhormon produzierenden Zelle (Weinbauer et al., 2000). Neben Androgenen produzieren sie auch Katecholamine, Neuropeptide und verschiedene Zytokine. Aufgrund ihrer neuroendokrinen Funktion mit Wirkung auf Steroidbildung, Durchblutung, Gefäßpermeabilität und ihres Einflusses auf die Spermatogenese, wird von manchen Autoren vermutet, dass die Leydig-Zellen neuroektodermalen Ursprungs sind. Ektopische Leydig-Zellen mit genannten Eigenschaften im Samenstrang weisen durch ihre Nähe zu Nervenfasern, Nerven- und Glomuszellen ebenfalls in diese Richtung (Davidoff et al., 2009).

1.1.2 Immunologie des Hodens

Der Schutz der Keimzellen vor der eigenen Immunabwehr ist von entscheidender Bedeutung für die männliche Fertilität (Meinhardt & Hedger, 2011). So ist der Hoden, neben Auge, Gehirn und Plazenta, eine sog. immunologisch privilegierte Region, in die Fremdgewebe ohne Abstoßung eingebracht werden kann (Meinhardt & Schuppe, 2003). Eine sonst stattfindende Antigen-spezifische Immunantwort wird im Hodengewebe und den dazugehörigen lymphatischen Strukturen aktiv kontrolliert. Für dieses Phänomen spielen, neben üblichen Mechanismen der Immuntoleranz, auch die Abschirmung der Antigene durch die Blut-Hoden-Schranke, zusätzlich zu einer grundsätzlich schwächeren Aktivierung des Immunsystems, eine Rolle (Meinhardt & Hedger, 2011). Eine regulatorische Wirkung bei der Vermeidung keimzellspezifischer Autoimmunreaktionen zeigen gewebständige Makrophagen, Mastzellen und in geringer Menge auch Lymphozyten. Testikuläre Immunzellen reagieren auf entzündliche Reize sogar nur mit einer abgeschwächten Reaktion (Meinhardt & Schuppe, 2003). Besonders wichtig für das Immunprivileg sind die somatischen Zellen des Hodens, besonders die Sertoli-Zellen, welche immunsuppressive Eigenschaften besitzen. Dies zeigt sich eindrücklich bei Co-Transplantationen von Sertoli-Zellen zusammen mit verschiedenen Allo- und Xenografts, wodurch eine Abstoßung letzterer vermieden bzw. verzögert wird.

Trotz dieser Fakten kann es zu Entzündungsreaktionen im Hoden kommen, was Tiermodelle der experimentellen Autoimmunorchitis und erregerbedingte Entzündungen bewiesen haben. Jedoch finden sich Entzündungen im Hoden im Vergleich zum Nebenhoden und dem übrigen Genitaltrakt wesentlich seltener. Unfruchtbarkeit durch Antikörperbildung gegen Spermatozoen, Autoimmunorchitis oder inflammatorische Infiltrate unbekannter Ätiologie können auftreten, wenn die Schutzmechanismen der Immunkontrolle versagen (Meinhardt & Hedger, 2011).

1.1.3 Orchitis

Trotz des Immunprivilegs gehören Infektionen und Entzündungen des männlichen Genitaltrakts zu den häufigsten Ursachen für Infertilität beim Mann. Dabei führen durch Antikörper gegen Spermien ausgelöste Autoimmunreaktionen, symptomatische sowie nicht-symptomatische Orchitiden, aber auch systemische Infektionen oder Krankheiten zu Störungen der Androgenproduktion und der Spermatogenese (Hedger & Meinhardt, 2003). Die akute Orchitis, welche mit starken Schmerzen und Schwellung des Hodens einhergeht, ist im Gegensatz zur chronischen, „stillen“ Entzündung leichter zu diagnostizieren. Das erklärt auch, warum man bei Männern mit vermeintlich idiopathischer Infertilität immunpathologische Prozesse ohne erkennbare infektiöse Ursache in Hodenbiopsien nachweisen konnte (el-Demiry et al., 1987).

Eine Orchitis kann sowohl durch Trauma als auch virale oder bakterielle Infektionen ausgelöst werden, zusätzlich auch kombiniert mit einer Nebenhodenentzündung als Epididymoorchitis. Dabei ist die Mumps-Orchitis als Komplikation einer Parotitis durch das Mumpsvirus am häufigsten und resultiert in 30% der Fälle in einer bilateralen Hodenatrophie mit Azoospermie. Aber auch im Rahmen einer Prostatitis oder Epididymitis, meist ausgelöst durch Gonokokken oder Chlamydien, kann eine Orchitis auftreten (Weidner et al., 1999).

Mithilfe des Modells der experimentell ausgelösten Autoimmunorchitis, auf der Basis der aktiven Immunisierung mit Hodenhomogenat und Adjuvans, konnten bereits Erkenntnisse über die Pathologie und organspezifische Autoimmunität gewonnen werden (Tung & Teuscher, 1995; Filippini et al., 2001; Fijak et al., 2005). Betrachtet man die Histopathologie

solcher Hoden, so findet man charakteristischerweise in den frühen Stadien peritubuläre und/oder interstitielle zelluläre Infiltrate. Im weiteren Verlauf der Erkrankung kommt es zur Einwanderung mononukleärer Zellen in das Interstitium und der Ablösung der Keimzellen bis hin zur Ausbildung von Granulomen, Nekrosen (Zhou et al., 1989) und dem vollständigen Fehlen der Spermatogenese (Doncel et al., 1989). Die experimentell ausgelöste Autoimmunorchitis ist T-Zell-vermittelt (Yule & Tung, 1993).

1.1.4 Innervation des Hodens

Welche funktionelle Rolle die Innervation des Hodens hat, konnte bisher noch nicht ausreichend geklärt werden. Die männlichen Gonaden werden von Nervenfasern des sensorischen und des autonomen Nervensystems versorgt (Zhu et al., 1995). Dabei vereinigen sich sympathische Fasern aus dem *Plexus mesentericus superior* und dem *Plexus renalis* zum *Plexus testicularis* (Syn. *N. spermaticus superior*), welcher zusammen mit der *A. testicularis* bis in die *Tunica albuginea* und das Hodenparenchym hineinzieht, jedoch nicht in die Samenkanälchen reicht (Kuntz & Morris, 1946; Holstein, 2003). Weitere Nervenfasern, auch als *N. spermaticus inferior* bezeichnet, stammen aus dem *Plexus mesentericus inferior* und dem *Plexus hypogastricus inferior* und erreichen Hoden und Nebenhoden über den Ductus deferens (Kuntz & Morris, 1946). Während Kuntz und Morris (1946) noch die Meinung vertraten, dass der Hoden hauptsächlich vom *N. spermaticus superior* versorgt wird, wurde dies von Hodson (1970) und Santamaria et al. (1990) mit dem Hinweis auf die Bedeutung der Innervation durch den *N. spermaticus inferior* erweitert.

Auch wenn in einigen Säugetierspezies autonome Nervenfasern sowohl mit dem Hodenparenchym als auch mit der Kapsel in Verbindung stehen (Prince, 1992; Setchell et al., 1994), zeigt das Hodenparenchym der Ratte immunhistologisch keine Innervation (Properzi et al., 1992). Vielmehr sind die Nerven im Bereich der Blutgefäße zu finden (Bell, 1972). Bei den meisten Nerven im Hoden handelt es sich um adrenerge/catecholaminerger/monoaminerger Fasern (Bell & McLean, 1973; Zhu et al., 1995; Wrobel & Moustafa, 2000), welche vor allem die Blutgefäße der Kapsel umgeben (Lamano Carvalho et al., 1986). Die Kapsel selbst wird sowohl adrenerg als auch cholinerg innerviert (Bell & McLean, 1973; Santamaria et al., 1990). Monoaminerger Nervenfasern konnten auch von Zhu et al. (1995)

nur entlang von Blutgefäßen innerhalb der Hodenkapsel, genauer gesagt im Anfangsbereich der *A. testicularis*, im Venenplexus und vorderen Abschnitt des oberen und unteren Pols nachgewiesen werden, jedoch nicht im Bereich des Parenchyms. Im beschriebenen Gebiet fanden sich auch PGP 9.5 und CPON positive Nervenfasern. Der immunhistologische Nachweis für VIP gelang nur innerhalb des Nervenplexus am unteren Pol. Denervationsexperimente an Hoden zeigten, dass die nervale Versorgung des vorderen oberen Pols und der Gefäße des Hodens vom *N. spermaticus superior* ausgeht, während der untere Pol vom *N. spermaticus inferior* innerviert wird (Zhu et al., 1995). Gong et al. konnten 2003 und 2006 nachweisen, dass es nach chirurgischer Durchtrennung der *Nn. spermatici* außerdem zu Apoptose von Spermatogonien und Leydig-Zellen kommt und somit die nervale Versorgung einen entscheidenden Einfluss auf die Spermatogenese zu haben scheint.

Wrobel et al. (1998) präsentierten mithilfe von immunhistochemischen Untersuchungen mit drei panneuralen Markern (PGP 9.5, NSE, Neurofilament) und einer modifizierten Acetylcholinesterasetechnik an Hoden verschiedener Säugetierspezies und des Menschen ebenfalls, dass es sich bei den Nerven des Hodens bei so gut wie allen Spezies um vaskuläre Nerven handelt, welche die Gefäße in Samenstrang, *Tunica albuginea*, *Septula testis* und *Mediastinum* versorgen. Große Hodenareale bleiben weitgehend frei von Nerven. Allerdings fanden sich auch Spezies-spezifische Unterschiede. So sind Hoden von Mensch und präpuberalem Schwein sehr stark innerviert. Die Innervation des Hodens von Rhesusaffen (Mayerhofer et al., 1996) und Schweinen (Wrobel & Brandl, 1998) zeigt überraschenderweise sogar altersabhängige Unterschiede und auch Untersuchungen an jungen adulten, menschlichen Hoden erbrachten den Nachweis, dass diese überhaupt nicht von monoaminergen, stattdessen übermäßig von peptidergen Nerven innerviert werden, welche vermutlich regulatorisch auf die testikuläre Funktion in diesem Alter wirken (Gong et al., 2009).

Die Synthese und Sekretion von Testosteron wird über die Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-Achse und durch para- bzw. autokrine Faktoren innerhalb des Hodens kontrolliert (Saunders, 2003; Holdcraft & Braun, 2004). Allerdings wird mittlerweile davon ausgegangen,

dass auch die Innervation des Hodens über den *N. spermaticus superior* und *inferior* einen bedeutenden Einfluss auf diesen Prozess hat. Im Rattenhoden führte die beidseitige Durchtrennung des *N. spermaticus superior* zu einer Erniedrigung der Testosteronproduktion, der Anzahl der LH-Rezeptoren im Hoden (Campos et al., 1993) und zu einer Inhibition des eigentlich durch Stress ausgelösten Anstiegs des Serumtestosterons (Frankel & Ryan, 1981). Auf die elektrische Stimulation des *N. spermaticus superior* hingegen reagierten Katzen mit einem Anstieg des Testosteronspiegels (Chiocchio et al., 1999). Bei direkter Verabreichung von Noradrenalin und Phentolamin zum *Ganglion mesentericum inferius* in einem ex vivo System verzeichneten Sosa et al. (2009) einen signifikanten Anstieg der Testosteronfreisetzung in den Gonaden, hingegen eine Abnahme bei der Zugabe von Propranolol. Äquivalente Versuche am *Ganglion mesentericum superius* zeigten jedoch keine Änderungen. Trotz intakter Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-Achse kommt es bei Ratten im Rahmen einer chronischen Rückenmarksverletzung zu Spermatogenesestörungen, weshalb angenommen wird, dass nicht-endokrine Mechanismen eine Rolle spielen müssen (Chow et al., 2000).

Auch wenn für Leydig-Zellen keine direkte Innervation nachgewiesen werden konnte (Suárez-Garnacho & Vega, 1990; Wrobel et al., 1998; Wrobel & Schenk, 2003), fanden sich bei Untersuchungen an Rattenhoden dennoch Nervenfasern mit synaptischen Vesikeln in ihrer unmittelbaren Umgebung (Suárez-Garnacho & Vega, 1990). Außerdem kommt es nach Denervation des Hodens Caspase-8-vermittelt zu Apoptose der Leydig-Zellen, Abfall des Serumtestosterons und massivem Anstieg des Plasma LH (Gong et al., 2009). Neben α - und β_2 -adrenergen Rezeptoren (Anakwe et al., 1985; Mayerhofer et al., 1992) exprimieren Leydig-Zellen auch PGP 9.5, NPY, CPON, VIP, DBH und 5-HT (Gong et al., 2009).

Die efferenten autonomen Nervenfasern entstammen hauptsächlich dem Sympathikus, aber auch parasympathische Fasern liegen im *Plexus testicularis*, wobei deren Herkunft unklar ist. Ebenso wenig weiß man über die afferenten Fasern des Hodens, welche Schmerzempfindungen ins 10. Thorakalsegment des Rückenmarks übertragen (Holstein, 2003).

1.2 Acetylcholin

Acetylcholin ist der wohl am längsten bekannte und auch am besten erforschte Neurotransmitter. Otto Loewi bewies bereits 1921, dass für die Übertragung eines Nervenimpulses ein chemischer Stoff verantwortlich sein musste, den er als „Vagusstoff“ bzw. „Parasympathin“ bezeichnete (Loewi, 1921; Loewi & Navratil, 1926). Henry Dale identifizierte diesen als Acetylcholin (Dale, 1914). Beide erhielten 1936 „*Für ihre Entdeckungen bei der chemischen Übertragung der Nervenimpulse*“ den Nobelpreis für Physiologie oder Medizin.

Neben dem zentralen und peripheren Nervensystem konnte Acetylcholin auch in Bakterien, Algen, Protozoen und primitiven Pflanzen nachgewiesen werden, was auf ein frühes entwicklungsgeschichtliches Vorkommen hinweist. Im menschlichen Organismus wurde Acetylcholin in non-neuronalen Zellen in Epithel (Lunge, Urogenitaltrakt), Mesothel (Pleura, Perikard), Endothel, Muskel und in Immunzellen (Granulozyten, Mastzellen) gefunden. Es muss also zwischen einem non-neuronalen cholinergen System mit non-neuronalem Acetylcholin als zellulärem Signalmolekül und einem neuronalen cholinergen System mit neuronalem Acetylcholin als Neurotransmitter unterschieden werden (Wessler et al., 2003a).

1.2.1 Das neuronale cholinerge System

Cholinerge Neurone synthetisieren, speichern und setzen Acetylcholin frei, welches als Signalmolekül zur Kommunikation innerhalb des Nervensystems, vor allem aber zwischen Neuronen und Effektorzellen dient. Dazu gehören, abgesehen von zentralen und parasymphatischen, auch periphere, intramural gelegene Neurone. Neben dem motorischen und sensorischen System werden komplexe, integrative neuronale Vorgänge wie Lernen und Gedächtnis, die sexuelle Aktivität, aber auch die vegetative Kontrolle des kardiovaskulären, respiratorischen, gastrointestinalen und urogenitalen Systems über Acetylcholin gesteuert. Acetylcholin bindet an und aktiviert dadurch verschiedene Subtypen von nikotinischen (nAChRs) und muskarinischen (mAChRs) Rezeptoren (Wessler et al., 1998). nAChRs vermitteln die chemische Erregungsübertragung an Neuronen, Ganglien, Interneuronen und

der neuromuskulären Endplatte, mAChRs spielen hingegen eine Rolle für die Übertragung zwischen Neuronen und Zielorgan wie Herz, glatter Muskulatur und Drüsen (Wessler & Kirkpatrick, 2008).

Auf der Grundlage von vier Komponenten wurde ein cholinerges System im Nervengewebe skizziert: (1) Acetylcholin, (2) Cholinesterasen, welche Acetylcholin zu Acetat und Cholin spalten, (3) Cholinacetyltransferasen, welche die Synthese von Acetylcholin aus Acetyl-Coenzym A (Acetyl-CoA) und Cholin katalysieren, (4) cholinerge Rezeptoren, an welche Acetylcholin binden kann (Sastry & Sadavongvivad, 1979).

1.2.1.1 Komponenten des neuronalen cholinergen Systems

Das synthetisierende Enzym Cholinacetyltransferase (ChAT)

In den Nervenendigungen des ersten autonomen und des zweiten parasympathischen Neurons ist die Cholinacetyltransferase (EC 2.3.1.6) als katalysierendes Enzym für die Synthese von ACh aus Acetyl-CoA aus dem Mitochondrium und Cholin, welches vorher über den hochaffinen Cholintransporter-1 in die Zelle aufgenommen wurde (Okuda & Haga, 2003), verantwortlich (Racké et al., 2006). Erstmals aus Gehirn und Nervengewebe isoliert und beschrieben wurde das Enzym 1943 von Nachmansohn und Machado. Es wird von cholinergen Neuronen exprimiert, weshalb es als spezifischster Marker für diese gilt und verwendet wird (Wessler et al., 1998). Für das Substrat Cholin weist ChAT eine sehr hohe Spezifität auf. Im Gehirn der Ratte zeigte sie jedoch für das zweite Substrat Acetyl-CoA die gleiche Affinität wie für Propionyl- und Butyryl-CoA (Rossier, 1977; Wessler et al., 1998). Aus diesem Grund könnte ChAT nicht nur Acetylcholin, sondern auch Propionylcholin oder Butyrylcholin synthetisieren (Wessler et al., 1998).

In allen bisher untersuchten Spezies kodiert nur ein Gen ChAT. Dieses ist beim Menschen auf Chromosom 10, Region 10q11.2-10q22.2, lokalisiert (Cohen-Haguenauer et al., 1990; Cervini et al., 1991; Strauss et al., 1991; Viegas-Pequignot et al., 1991). Das ChAT-Gen der Ratte besteht aus mindestens drei 5'-nicht-kodierenden Exons, sog. R-, N- und M-Typen, und 14 kodierenden Exons (Misawa et al., 1992; Kengaku et al., 1993). Aufgrund verschiedener Promoterregionen und alternativen Spleißens sind verschiedene mRNA-Varianten (von 1,4-4 kb) möglich, was auf eine komplexe und unterschiedliche Regulation

der Expression von ChAT hinweist. Die genaue Anzahl an Isoenzymen ist aber bis jetzt noch unbekannt (Benishin & Carroll, 1983; Wu & Hersh, 1994). Es wurden in der Ratte mindestens sieben verschiedene ChAT mRNA Transkripte identifiziert (Ibanez et al., 1991a; Wu & Hersh, 1994). Fünf verschiedene Isoenzyme von ChAT konnten mithilfe von biochemischen Methoden im Gehirn der Ratte als membrangebunden und drei im Zytosol nachgewiesen werden. Dabei unterschieden sich die drei zytosolischen Formen, im Gegensatz zu den membrangebundenen, kaum in ihren Eigenschaften (Wu & Hersh, 1994). Wachstumsfaktoren verstärken die Expression des ChAT-Gens vermutlich durch Aktivierung von Tyrosinkinasen und auch Sexualhormone und Glukokortikoide können die Expression und/oder Aktivität von ChAT beeinflussen (Wu & Hersh, 1994; Münch et al., 1997; Reinheimer et al., 1998a).

Neben ChAT wird Acetylcholin auch von der Carnitinacetyltransferase (CarAT) synthetisiert, welche z.B. im Herz- und Skelettmuskel von Säugetieren gefunden wurde (Tuček, 1982). Da eine Co-Expression beider Enzyme in einigen Geweben von Säugern vorkommen kann, ist es äußerst wichtig diese mithilfe von spezifischen Inhibitoren, Bromoacetylcholin für ChAT und Bromoacetylcarnitin für CarAT, zu differenzieren (Tuček, 1982).

Abgesehen von der vor allem im zentralen Nervensystem vorkommenden Variante von ChAT, der sogenannten cCHAT (c=common), wurde im peripheren Gewebe mithilfe von Western Blot und Immunhistochemie die ebenfalls für ein Protein kodierende Form, pCHAT (p=peripheral), nachgewiesen. Diese entsteht aufgrund alternativen Spleißens, so dass die Exone 6, 7, 8 und 9 fehlen (Tooyama & Kimura, 2000). Während cChAT sowohl im Nucleus als auch im Zytoplasma lokalisiert ist, konnte pChAT mit grün fluoreszierendem Protein (GFP) nur im Zytoplasma detektiert werden. Durch die Behandlung mit Leptomycin B erfolgte die Translokation von pChAT in den Nucleus (Matsuo et al., 2005).

Der vesikuläre Acetylcholin-Transporter (VAChT)

Acetylcholin wird im Austausch mit zwei Protonen mittels des monospezifischen VAChT in synaptische Vesikel aufgenommen und gespeichert (Anderson et al., 1983; Marshall &

Parsons, 1987; Erickson et al., 1994; Parsons, 2000). Dieser Transporter besteht aus 532 Aminosäuren in 12 Transmembrandomänen und kann durch Vesamicol gehemmt werden. Das VACHT-Gen wurde auf Chromosom 10 lokalisiert, auf welchem sich auch das ChAT-Gen befindet.

Überraschenderweise liegt die komplette Sequenz ohne Unterbrechung innerhalb des ersten Introns des ChAT-Gens (Erickson et al., 1994), so dass die Expression beider miteinander assoziiert sein könnte.

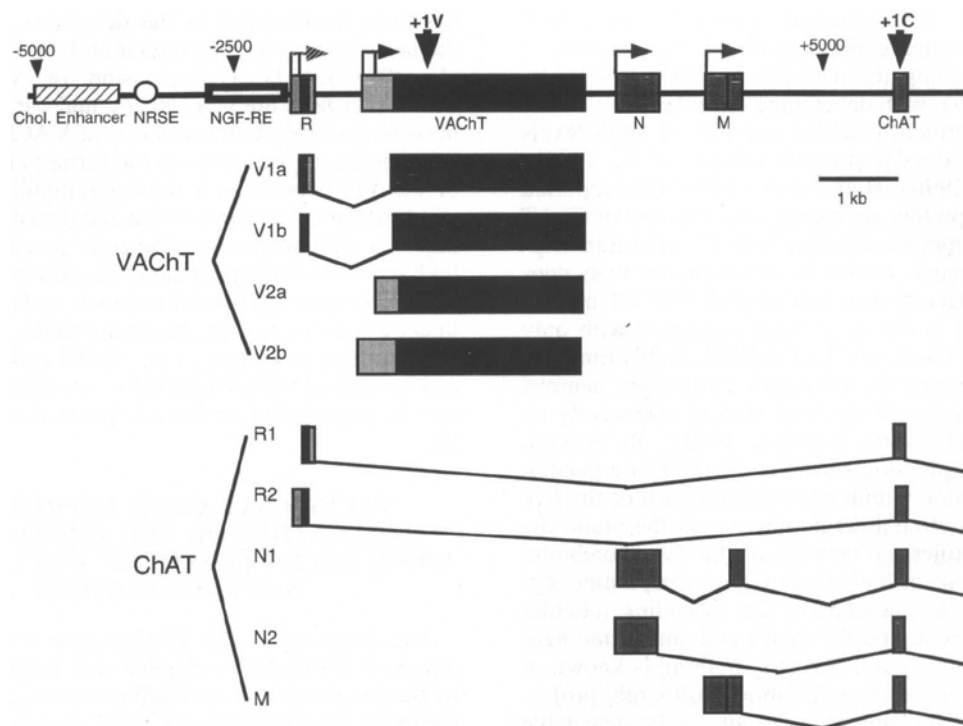


Abb. 1-4: Schematische Darstellung des cholinergen Genlocus. Transkription von VACHT und ChAT (Eiden, 1998).

Dies wird auch als cholinerges Genlocus bezeichnet (Wessler et al., 1999). Das VACHT-Gen verwendet zwei der R Promotoren von ChAT, besitzt aber auch noch zwei spezifische Promotoren V1 und V2 (Cervini et al., 1995). Neurotransmittersysteme betreffend, scheint die Co-Lokalisation zweier Gene, deren Funktionen sich ergänzen, einzigartig zu sein. Dies lässt vermuten, dass Synthese und Speicherung von ACh streng kontrolliert und co-reguliert werden (Berrard et al., 1995; Berse & Blusztajn, 1995). Allerdings wurde bereits gezeigt, dass ChAT auch unabhängig von VACHT exprimiert werden kann (Ogawa et al., 2003).

Die Freisetzung von Acetylcholin in den synaptischen Spalt oder extrazellulären Raum erfolgt, ausgehend von einem Konzentrationsanstieg des intrazellulären Calciums, durch die

Verschmelzung der Speichervesikel mit der präsynaptischen Membran (Jahn & Südhof, 1994).

Die nikotinischen und muskarinischen Acetylcholin-Rezeptoren

Das freigesetzte Acetylcholin kann an zwei verschiedene Gruppen von Rezeptoren binden: nikotinische und muskarinische. Bei den nikotinischen Rezeptoren (nAChR) handelt es sich um ligandengesteuerte Ionenkanäle, deren Aktivierung zu einem Einstrom positivgeladener Ionen und damit zur Membrandepolarisation führt. Dabei sind fünf homologe oder identische Untereinheiten so angeordnet, dass sie einen zentralen Ionenkanal bilden. An der neuromuskulären Endplatte lagern sich zwei α -, eine β -, eine δ - und eine γ - oder eine ε -Untereinheit zu einem Rezeptor zusammen. Die γ -Untereinheit findet sich im embryonalen, während die ε -Untereinheit im adulten Muskel exprimiert wird. Dabei kommt es im Laufe der Entwicklung zu einer veränderten Transkription desselben Gens (Millar, 2003).

Neuronale nikotinische Rezeptoren werden entweder von zwei verschiedenen Typen von Untereinheiten (2α und 3β) oder fünf α -Untereinheiten (Homo- und Heteropentamer) gebildet. Inzwischen sind neun verschiedene α - und vier verschiedene β -Untereinheiten identifiziert (Sargent, 1993; Galzi & Changeux, 1995; Millar, 2003).

Die muskarinischen Rezeptoren (mAChR) gehören zur Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren. Hier werden fünf Subtypen (m1-m5) unterschieden (Caulfield, 1993; Caulfield & Birdsall, 1998). Die G-Proteine sind heterotrimer, das heißt, sie bestehen aus einer α -, β - und γ -Untereinheit. Die Bindung von ACh an den Rezeptor führt zur Dissoziation der α - von der β/γ -Untereinheit und zur Aktivierung intrazellulärer Signalwege. Anhand der α -Untereinheit erfolgt die Einteilung der G-Proteine in vier Familien, welche unterschiedlich mit den fünf Subtypen assoziiert sind (Caulfield, 1993; Gudermann et al., 1996).

Das hydrolysierende Enzym Acetylcholinesterase

Nach der Freisetzung und etwaigen Bindung an Rezeptoren wird Acetylcholin von der spezifischen Acetylcholinesterase (EC 3.1.1.7) oder unspezifischen Cholinesterasen (Pseudo-, Butyryl-, Plasmacholinesterase; EC 3.1.1.8) wieder in seine Bestandteile Acetat und Cholin

gespalten und somit inaktiviert (Wessler et al., 2001a). Nahezu alle Zellen, ob neuronal oder non-neuronal, weisen Cholinesteraseaktivität auf. Das Vorkommen einer unspezifischen Cholinesterase wurde in Leber, Lunge und Kreislauf nachgewiesen (Wessler et al., 1998, 1999, 2001a).

Der hochaffine Cholintransporter-1 (ChT1)

Da Cholin nicht in Neuronen synthetisiert werden kann, ist die ACh-Synthese vom geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Wiederaufnahme von Cholin in die Präsynapse abhängig (Kuhar & Murrin, 1978). Cholin selbst kann die Zellmembran nicht passieren, so dass ein Transportsystem notwendig ist. In Synaptosomen des Gehirns konnte dafür der hochaffine Cholintransporter nachgewiesen werden (Haga, 1971; Haga & Noda, 1973), welcher als einzigartig in cholinergen Neuronen gilt (Kuhar & Murrin, 1978). Die Aufnahme von Cholin über ChT ist Na^+/Cl^- -abhängig und kann durch Hemicholinium-3 inhibiert werden. Okuda et al. (2000) gelang es die cDNA des ersten hochaffinen Cholintransporters ChT1 aus *Caenorhabditis elegans* und der Ratte zu isolieren. Kurz darauf wurde er auch für den Menschen kloniert (Apparsundaram et al., 2000). ChT1 cDNAs aus Mensch und Ratte kodieren ein Protein aus 580 Aminosäuren. Beeindruckend ist der hohe Grad an Sequenzkonservierung und die damit verbundene Homologie des ChT1 in verschiedenen Spezies. ChT1 zeigt außerdem signifikante Homologien zu Na^+ -abhängigen Glukosetransportern, nicht aber zu Neurotransmitter-Transportern (Okuda & Haga, 2003).

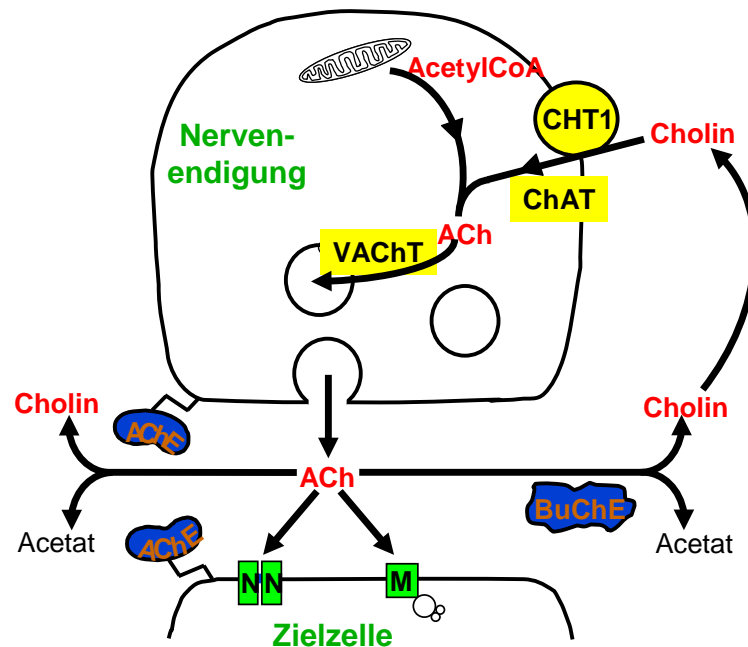


Abb. 1-5: Synthese, Freisetzung und Recycling von ACh anhand einer cholinergen Zelle. AChE = Acetylcholinesterase, BuChE = Butyrylcholinesterase, ChT1 = hochaffiner Cholintransporter-1, ChAT = Cholinacetyltransferase, M = muskarinischer Rezeptor, N = nikotinischer Rezeptor, VACHT = vesikulärer ACh-Transporter. Modifiziert nach Kummer et al., 2008.

1.2.2 Das non-neuronale cholinerge System

Bereits 1914 lieferte Ewins den Nachweis für das Vorkommen von Acetylcholin in Pflanzen. Später wurde gezeigt, dass es außerdem in der Milz von Pferden, menschlicher Plazenta, in Schwämmen und Einzellern vorliegt (Dale & Dudley, 1929; Beyer & Wense, 1936; Comline, 1946; Bülbring et al., 1949; Lentz, 1966; Saxena et al., 1966; Jaffe, 1970; Hartmann & Kilbinger, 1974). Laut Whittaker (1963) ist Acetylcholin in non-neuronalem Gewebe nachweisbar und in der Natur so weit verbreitet, dass durchaus von einer Funktion außerhalb des Nervensystems ausgegangen werden kann. Auch Sastry & Sadavongvivad beschrieben 1979, dass in Geweben ohne nervale Innervation wie menschlicher Plazenta, Erythrozyten und Spermatozoen eine oder mehrere Komponenten des cholinergen Systems aus dem Nervengewebe vorhanden sind. Der Begriff des „non-neuronalen cholinergen Systems“ deutet darauf hin, dass die Synthese von Acetylcholin in den Zellen unabhängig von Neuronen erfolgt und dass dieses lokal als auto- oder parakriner Botenstoff wirkt (Wessler et al., 1998). Im Gegensatz zu seinem neuronalen Pendant hat das non-neuronale

Acetylcholin Einfluss auf non-neuronale Zellfunktionen wie Proliferation, Differenzierung, Organisation des Zytoskeletts, Regulation von Zell-Zell-Kontakten, Migration, Zilienaktivität und Funktionen von Immunzellen (Wessler et al., 2003a). Seine Existenz erklärt, warum auch Zellen, welche nicht von cholinergen Neuronen innerviert werden, dennoch muskarinische und nikotinische Rezeptoren exprimieren (Wessler et al., 1998).

Es gab die Vermutung, Acetylcholin werde von Neuronen synthetisiert und womöglich dann von non-neuronalen Zellen aufgenommen. Diese Hypothese kann dadurch widerlegt werden, dass direkt in non-neuronalen Zellen neben einer immunhistochemischen Lokalisation auch der Nachweis der Enzymaktivität für ChAT gelang. Außerdem konnte Acetylcholin aus frisch isolierten oder kultivierten Zellen ohne Nervengewebe gewonnen werden (Reinheimer et al., 1998a; Wessler et al., 2001a).

Die Tabellen 1-1 und 1-2 geben eine Übersicht, in welchen non-neuronalen Zellen bzw. Geweben des Menschen und der Ratte ACh bereits nachgewiesen wurde.

Epithelzellen	
Atemwege	Zilientragende Zellen, Basalzellen, sekretorische Zellen des Bronchialepithels
Verdauungstrakt	Mundhöhle, Ösophagus, Magen, Jejunum, Ileum, Kolon, Sigma, Gallenblase
Urogenitaltrakt	Nierenbecken, Ureter, Harnblase, Vagina, Granulosazellen
Niere	Tubuli
Auge	Kornea
Haut	Keratinocyten, Schweiß-, Talgdrüsen
Plazenta	Trophoblast
Drüsengewebe	Azini, Weibliche Brust, Thymus
mesotheliale Zellen	Viszerale Pleura, Mesenterialwurzel, Perikard, Aortenklappe
Endothelzellen	Lungengefäße, Nabelvene, Haut
mesenchymale Zellen	Adipozyten, Fibroblasten, glatte Muskulatur, Sehnen
Parenchym	Leber, Schilddrüse
Blutzellen	Thrombozyten
Immunzellen	Mononukleäre Zellen, Dendritische Zellen, Makrophagen, Mastzellen der Haut
Gehirn	Astrozyten
Andere	Haare, Nägel, Fettgewebe

Tab. 1-1: Humanes non-neuronales Gewebe, in welchem ACh mithilfe von HPLC oder ChAT mittels Immunhistologie nachgewiesen wurde (aus Wessler et al., 1998; Wessler & Kirkpatrick, 2008).

Epithelzellen	
Atemwege	Zellen des Trachealepithels
Verdauungstrakt	Ösophagus, Magen, Dünn- und Dickdarm
Urogenitaltrakt	Harnblase
Auge	Kornea
Haut	Keratinozyten
Plazenta	Trophoblast
mesotheliale Zellen	Viszerale/parietale Pleura, Perikard, Mesenterium, Nieren-/Hodenkapsel
Endothelzellen	Aorta, Vena cava, Endokard
Parenchym	Leber, Pankreas, Milz, Schilddrüse, Niere, Hoden, Ovar
Immunzellen	Alveolarmakrophagen, Thymus, Mikroglia
Andere	Astrozyten, Pinealozyten, Fettgewebe

Tab. 1-2: Non-neuronaies Gewebe der Ratte, in welchem ACh mithilfe der HPLC nachgewiesen wurde (aus Wessler et al., 1998).

1.2.2.1 Komponenten des non-neuronalen cholinergen Systems

Obwohl die Cholinacetyltransferase hauptsächlich von cholinergen Neuronen exprimiert wird, konnte sie dennoch in vielen non-neuronalen Zellen von Säugetieren u.a. immunhistochemisch nachgewiesen werden. So exprimieren Epithel- und Endothelzellen verschiedener Organe, neben Immunzellen und mesothelialen Zellen der Pleura und des Perikards, das ACh-synthetisierende Enzym (Wessler et al., 1999 & 2003a).

Inwiefern die Speicherung von Acetylcholin in non-neuronalen Zellen erfolgt ist unklar, da keine Speicherorganellen identifiziert werden konnten. Wahrscheinlich besteht ein Gleichgewicht zwischen kontinuierlicher Synthese, Diffusion, Freisetzung und Hydrolyse (Wessler et al., 2003a). Allerdings konnte VACHT im Endothel mithilfe von RT-PCR (Haberberger et al., 2000) und Immunhistologie (Kirkpatrick et al., 2001) nachgewiesen werden, was eine Speicherung in Vesikeln wahrscheinlich macht. Aus diesem Grund könnte die Freisetzung des non-neuronalen Acetylcholins über Endosomen oder Vesikel, welche mit der Zellmembran verschmelzen, erfolgen (Wessler et al., 1998). Malo & Israël (2003) zeigten in Endothelzellen der Ratte (RBE4), dass vermutlich auch das sogenannte Mediatophor (Dunant & Israël, 1995) kalziumabhängig ACh freisetzt. Ein weiterer Weg ACh aus der Zelle zu transportieren, sind die organischen Kationentransporter OCT1-3. Sie

gehören zur SLC 22 Familie (solute carrier family) und haben unabhängig von Subtyp oder Spezies folgende Gemeinsamkeiten. Zum einen sind sie polyspezifisch, was bedeutet, dass ihre Substrate verschiedene Größen und molekulare Strukturen haben können. Außerdem können sie von verschiedenen Komponenten inhibiert werden. Zum anderen transportieren sie organische Kationen unabhängig von Na^+ , Cl^- oder H^+ -Ionen und in beide Richtungen über die Plasmamembran. Entscheidend dafür ist der elektrochemische Gradient der transportierten Kationen. Neben ACh sind Dopamin, Serotonin, Histamin, Cholin, Kreatinin, Guanidin und Thiamin weitere endogene Substrate (Koepsell et al., 2003, 2007). Steroide können OCTs inhibieren (Hayer-Zillgen et al., 2002), auch wenn sie selbst wahrscheinlich nicht transportiert werden (Koepsell et al., 2003). Gründemann et al. identifizierten 1994 erstmals OCT1 in der Niere der Ratte. 1996 folgte der Nachweis von OCT2 in der Ratte (Okuda et al., 1996) und 1998 OCT3 bei Ratte und Mensch (Gründemann et al., 1998; Kekuda et al., 1998). OCT1 wird in allen Spezies am stärksten in der Leber exprimiert, in Nagern besonders in der Niere, aber auch in Dünndarm, Haut und Milz. Die Expression von OCT2 beschränkt sich vor allem auf die Niere, konnte darüber hinaus in Neuronen des ZNS und Plazenta des Menschen und in Thymus und Plexus choroideus der Ratte nachgewiesen werden. OCT3 ist mit seiner Lokalisation in Skelettmuskel, Leber, Plazenta, Niere, Herz, Gehirn des Menschen und Plazenta, Dünndarm, Herz, Gehirn, Niere, Thymus, Blutgefäße, Haut der Ratte sehr weit verbreitet (Koepsell et al., 2003). Den direkten Beweis, dass non-neuronales Acetylcholin mittels OCT, vor allem OCT1 und 3, freigesetzt wird, lieferten Wessler et al. (2001b) durch Untersuchungen an der Plazenta des Menschen. Andererseits zeigten Lips et al. (2005), dass in *Xenopus laevis* ACh ausschließlich von OCT1 und 2 transportiert wird, in der Trachea von Mensch und Ratte sowie den Bronchi von Mensch allerdings alle drei Kationentransporter vorhanden sind.

Neben Neuronen und Zellen, welche von cholinergen Neuronen innerviert werden, sind auch in Geweben ohne neuronale Strukturen wie Epithel-, Endothelzellen, Plazenta, Epidermis (Sastry & Sadavongvivad, 1979; Brunner et al., 1990; Grando et al., 1993a+b, 1995, 1996) und auch auf zirkulierenden Blutzellen (Atweh et al., 1984; Hiemke et al., 1996) nikotinische und muskarinische Rezeptoren zu finden. Menschliche Keratinozyten

exprimieren zum Beispiel sowohl $\alpha 3$ -, $\alpha 5$ - und $\alpha 7$ -Untereinheiten des nikotinischen Rezeptorkomplexes als auch muskarinische Rezeptoren (Grando et al., 1995, 1996). Aus diesem Grund dienen die klassischen Rezeptoren des neuronalen cholinergen Systems auch als Angriffspunkt für non-neuronales Acetylcholin, vermutlich mit einer auto-/parakrinen Wirkung. Des Weiteren scheint das zytosolische Acetylcholin direkt mit intrazellulären Signalmolekülen, wie zum Beispiel GTP-bindenden Proteinen, in Interaktion zu treten (Wessler et al., 1998, 2001a).

Non-neuronales Acetylcholin, welches in den Kreislauf gelangt ist, wird wahrscheinlich vor allem von Cholinesterasen aus Erythrozyten und Plasma abgebaut, um eine lokale Wirkung zu gewährleisten und eine systemische, ähnlich wie bei Hormonen, zu vermeiden (Wessler et al., 1998, 1999, 2001a).

1.2.2.2 Pathophysiologische Rolle des non-neuronalen cholinergen Systems in entzündlich verändertem Gewebe

Da das non-neuronale System in Immunzellen und Schleimhautepithelien sehr stark vorhanden ist, liegt es nahe, dass es an entzündlichen Erkrankungen, z.B. chronischen Entzündungen der Schleimhaut oder allergischen Erkrankungen, beteiligt sein könnte (Wessler et al., 1998, 2003a). Vermutlich spielt es bei der Kontrolle der Barrierefunktion innerer und äußerer Oberflächen, aber auch der Aktivierung und Proliferation von Immunzellen eine Rolle (Wessler et al., 1998). Bereits 1962 beschrieb Scott erhöhte ACh-Spiegel in entzündlichen Hautkrankheiten. Dies konnte durch Hautbiopsien bei Patienten mit atopischer Dermatitis mit einem erhöhten Gehalt an ACh in der Epidermis bestätigt werden (Wessler et al., 2003b; Reinheimer et al., 1998b). Glukokortikoide hingegen supprimieren ChAT (Reinheimer et al., 1998a+b).

Versuche an nikotinischen Rezeptoren zeigten die Möglichkeit der anti-inflammatorischen Regulation (Racké et al., 2006). Über nikotinische Rezeptoren auf Makrophagen konnte die Freisetzung von $\text{TNF-}\alpha$ und anderen Zytokinen mit Acetylcholin und Nikotinrezeptoragonisten inhibiert werden (Borovikova et al., 2000). Dadurch, dass dies über die Stimulierung des *N. vagus* und somit den cholinergen anti-inflammatorischen Pfad ausgelöst wurde, ist fraglich, ob es sich um neuronales oder non-neuronales ACh handelt.

1.3 Zielsetzung der Arbeit

Bisherige Untersuchungen zum non-neuronalen cholinergen System am männlichen Genitale haben sich hauptsächlich auf Spermatozoen oder den Nebenhoden bezogen. Eine eingehende Untersuchung des Hodens im Hinblick auf die einzelnen Komponenten des non-neuronalen cholinergen Systems war bisher noch nicht erfolgt, obwohl deren Vorkommen aufgrund der mangelnden parasymphatischen Innervation des Hodens bzw. der fehlenden Innervation des Hodenparenchyms bei Nagern angenommen werden kann.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte zunächst die Expression einzelner Komponenten des non-neuronalen cholinergen Systems mittels RT-PCR-Analyse in verschiedenen isolierten Zellen des Hodens untersucht werden. Anschließend wurden die ermittelten Ergebnisse durch Immunfluoreszenzmikroskopie an Kryostatschnitten von unbehandelten Rattenhoden verifiziert. Weitere Experimente beschäftigten sich mit dem Einfluss der experimentellen Autoimmunorchitis auf Lokalisation und Expression der Komponenten des non-neuronalen cholinergen Systems.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Reagenzien

Chemikalien (allgemein)	Hersteller
Aceton reinst	Merck KGaA, Darmstadt
Agarose	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
β -Mercaptoethanol	AppliChem GmbH, Darmstadt
Calciumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt
Chloroform	Merck KGaA, Darmstadt
DEPC (Diethylpyrocarbonat)	CARL ROTH GMBH + CO. KG, Karlsruhe
DMSO (Dimethylsulfoxid)	CARL ROTH GMBH + CO. KG, Karlsruhe
EDTA (Ethyldiamintetraacetat)	CARL ROTH GMBH + CO. KG, Karlsruhe
Essigsäure (Eisessig)	Merck KGaA, Darmstadt
Ethanol	Sigma-Aldrich Co., Steinheim
Formaldehydsg. mind. 37%, säurefrei	Merck KGaA, Darmstadt
Isofluran	Baxter, Unterschleißheim
Isopentan (2-Methylbutan)	Sigma-Aldrich Co., Steinheim
Isopropanol (2-Propanol)	Sigma-Aldrich Co., Steinheim
Magnesiumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt
Manganchlorid	Merck KGaA, Darmstadt
Methanol	Sigma-Aldrich Co., Steinheim
8-MOP (8-Methoxypsoralen)	Sigma-Aldrich Co., Steinheim
Natriumacetat	Merck KGaA, Darmstadt
di-Natriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)	Sigma-Aldrich Co., Steinheim
Natriumdihydrogenphosphat (NaH_2PO_4)	Sigma-Aldrich Co., Steinheim
Pikrinsäure krist., reinst	Merck KGaA, Darmstadt
Roti®-Phenol/Chloroform	CARL ROTH GMBH + CO. KG, Karlsruhe
TRIS (Tris(hydroxymethyl)- aminomethan)	CARL ROTH GMBH + CO. KG, Karlsruhe
Triton X-100	Sigma-Aldrich Co., Steinheim
Trizol®	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Tween 20	CARL ROTH GMBH + CO. KG, Karlsruhe
Wasserstoffperoxid 30% (H_2O_2)	Merck KGaA, Darmstadt
Reagenzien (PCR)	Hersteller
Ampuwa®	Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg
Aqua ad iniectabilia	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
100 bp DNA Marker	Promega, Madison, USA

DNase I, RNase-frei	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
DNase 10×Reaktionspuffer	Promega, Madison, USA
Ethidiumbromidlösung	CARL ROTH GMBH + CO. KG, Karlsruhe
Magnesiumchloridlösung	Promega, Madison, USA
M-MLV RT 5×Reaktionspuffer	Promega, Madison, USA
M-MLV RT RNase H Minus, Punktmutante	Promega, Madison, USA
Oligo (dT) ₁₅ Primer	Promega, Madison, USA
PCR Nukleotid Mix (dNTPs)	Promega, Madison, USA
Rekombinanter RNasin®	Promega, Madison, USA
Ribonuklease Inhibitor	
0.24-9.5 kb RNA-Marker	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Taq DNA Polymerase	Laboreigene Herstellung
Taq DNA Polymerase	Promega, Madison, USA
Taq DNA Polymerase 10×Puffer mit 15 mM MgCl ₂	Laboreigene Herstellung
Thermophiler DNA Polymerase 10×Puffer, Mg ²⁺ -frei	Promega, Madison, USA

2.1.2 Geräte

Geräte (allgemein)	Hersteller
Direct-Q™	Millipore Corporation, Billerica, USA
Reinstwasseraufbereitungs-System	
DRI Block DB2A Heizblock	Techne AG, Jansddorf
E143 Power Supply	CONSORT nv, Turnhout, BE
E831 Power Supply	CONSORT nv, Turnhout, BE
E832 Power Supply	CONSORT nv, Turnhout, BE
Easypet 4420 Pipette	Eppendorf AG, Hamburg
Heizblock 120 Thermolader	UniEquip GmbH, Martinsried
Heraeus® Biofuge Fresco Zentrifuge	Kendro Laboratory Products GmbH, Langenselbold
MC 6 Tischzentrifuge	SARSTEDT AG & Co, Nümbrecht
MR 3001K Magnetrührer	Heidolph Instruments, Schwabach
MS2 Minishaker	IKA® Werke GmbH & Co. KG, Staufen
Orbitalschüttler 3017	GFL Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Burgwedel
pH-Meter 766 Calimatic	Knick Elektronische Messgeräte GmbH & Co. KG, Berlin
RCT basic Magnetrührer	IKA® Werke GmbH & Co. KG, Staufen
Reference-Pipetten	Eppendorf AG, Hamburg
Research-Pipetten	Eppendorf AG, Hamburg
SPB 53 Waage	Scaltec Instruments GmbH, Göttingen
Ultrospec 2100 pro Spektralphotometer	Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg

Geräte (PCR)	Hersteller
Gel Jet Imager	INTAS Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen
Gelelektrophoresezubehör	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
iCycler	BIO-Rad Laboratories GmbH, München
Primus 96 advanced PCR-Maschine	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
PTC 200 PCR-Maschine	BIOZYM Gesellschaft für Enzymtechnologie mbH, Hamburg
UV-Systeme	INTAS Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen

Die Auswertung der semi-quantitativen RT-PCR (isolierte Zellen) erfolgte mit dem Programm Quantity One, Version 4.5.0, 1D-Analysis Software, BIO-Rad Laboratories, München. Die quantitative RT-PCR (RealTime) wurde mithilfe des Programms IBM® SPSS® Statistics 18, SPSS Inc., ausgewertet.

Geräte (Immunfluoreszenz)	Hersteller
Axioplan 2 Imaging	Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen
Fluoreszenzmikroskop	
CM 1900 Kryostat	Leica, Wetzlar
ebq100 Quecksilberdampfkurz-bogenlampe	Leistungselektronik Jena GmbH, Jena

2.1.3 Puffer und Lösungen

Puffer und Lösungen	Zusammensetzung
Absättigungslösung für Zamboni-Fixierung	10% (v/v) NSS in PBS 0,5% (v/v) Tween 20 0,1% (v/v) BSA
Absättigungslösung für Aceton-Fixierung	50% (v/v) Pferde-Serum
DEPC-H ₂ O	0,1% (v/v) DEPC 0,9% (v/v) Ethanol
100 bp DNA-Marker	5 µl 100 bp DNA Marker (Promega) 4 µl Aqua ad iniectabilia (B.Braun) 1 µl 10×DNA-Probenpuffer (Xylencyanol FF+Bromophenolblau)
6×DNA-Probenpuffer	0,25% (w/v) Xylencyanol FF 0,25% (w/v) Bromophenolblau 30% (v/v) Glycerol in H ₂ O

10×DNA-Probenpuffer I	0,4% (w/v)	Xylencyanol FF
	0,4% (w/v)	Bromophenolblau
	50% (v/v)	Glycerol in H ₂ O
10×DNA-Probenpuffer II	0,4% (w/v)	Xylencyanol FF
	50% (v/v)	Glycerol in H ₂ O
10×DNaseI-Reaktionspuffer	1 M	Tris-HCl (pH 7,8)
	66 mM	MnCl ₂
	100 mM	CaCl ₂
	100 mM	MgCl ₂
Ethidiumbromidlösung 0,1%	Stammlösung 1%, 1:10 verdünnt	
Ethidiumbromidlösung 0,3%	Stammlösung 1%, 1:3 verdünnt	
Fixationslösung (pH 7,2-7,4)	4% (w/v)	Paraformaldehyd
	0,1 M	Phosphatpuffer
gepuffertes Glycerol (pH 8,6)	1,5 M	Na ₂ CO ₃
	1,5 M	NaHCO ₃
	Glycerol, wasserfrei	
10×MOPS-Puffer pH 7,0 (laboreigenes Optimum)	0,2 M	MOPS
	50 mM	Natriumacetat wasserfrei
	10 mM	EDTA pH 8,0
PBS (5 l, pH 7,4)	28,75 ml	0,2 M NaH ₂ PO ₄ × 2 H ₂ O (Lsg.A)
	96,20 ml	0,2 M Na ₂ HPO ₄ × 2 H ₂ O (Lsg.B)
	22,4 g	NaCl
PBS+S (5 l, pH 7,4)	28,75 ml	0,2 M NaH ₂ PO ₄ × 2 H ₂ O (Lsg.A)
	96,20 ml	0,2 M Na ₂ HPO ₄ × 2 H ₂ O (Lsg.B)
	44,8 g	NaCl
Phosphatpuffer (0,2 M, pH 7,4)	Lsg.A: 31,2 g NaH ₂ PO ₄ × 2 H ₂ O (1l)	
	Lsg.B: 35,6 g Na ₂ HPO ₄ × 2 H ₂ O (1l)	
	230 ml Lsg.A + 770 ml Lsg.B	
10×Reaktionspuffer mit 15 mM MgCl₂ (steril filtriert)	100 mM	Tris-HCl (pH 9,0 bei 25°C)
	500 mM	KCl
	15 mM	MgCl ₂
	1%	Triton®X-100
RNA-Marker	3 µl	RNA-Marker (Invitrogen)
	2 µl	Aqua ad iniectabilia (B.Braun)
	20 µl	RNA-Probenpuffer
RNA-Probenpuffer	750 µl	Formamid
	150 µl	10×MOPS-Puffer
	250 µl	Formaldehyd
	100 µl	H ₂ O (steril)
	100 µl	Glycerin
	80 µl	1% Bromophenolblau

50×TAE (Stocklösung/Liter)	242 g	TRIS
	57,1 ml	Essigsäure
	100 ml	0,5 M EDTA (pH 8,0)
Zamboni-Fixativ (1 l)	2% (v/v)	Formaldehyd
	0,1 M	Phosphatpuffer
	15% (v/v)	Pikrinsäure (2-fach gefiltert)

2.1.4 Versuchsmaterial

Material	Hersteller
Deckgläser (24 × 60 mm, Glasdicke 0,13-0,17 mm)	R. Langenbrinck, Labor- und Medizintechnik, Teningen
MILLEX®GP Syringe Driven Filter Unit 0,22 µm	Millipore Corporation, Billerica, USA
Objektträger (25 × 75 × 1 mm)	R. Langenbrinck, Labor- und Medizintechnik, Teningen
Precellys-Keramik-Kit 2,8 mm, Keramikkügelchen	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Precellys-Stahl-Kit 2,8 mm, Stahlkügelchen	
Reaktionsgefäße PP, 0,2 ml	Nerbe Plus GmbH, Winsen/Luhe
Tissue-Tek®	Sakura Finetek Europe B.V., Zoeterwoude, NL
VECTASHIELD® Trägermedium mit DAPI	Vector Laboratories, Burlingame, USA

2.1.5 Kits

iQ™ SYBR® Green Supermix	BIO-Rad Laboratories GmbH, München
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden

2.1.6 Primer

Alle Primer zur Detektion des cholinergen Systems im Hoden wurden von der Arbeitsgruppe Kardiopulmonale Neurobiologie unter der Leitung von Prof. Dr. Kummer zur Verfügung gestellt. Sie wurden mithilfe der Primer3 Software (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi) entworfen und von MWG Biotech, Ebersberg, bezogen.

Die Sequenz der 18S-rRNA-Oligonukleotid-Primer wurde ebenfalls mithilfe der Primer3 Software ermittelt und ebenso wie die GAPDH-Oligonukleotid-Primer von MWG Biotech, Ebersberg, erworben. Die lyophilisierten 18S-RNA Primer (forward und reverse) wurden in $1 \times \text{TE pH } 8,0$ aufgenommen ($100\text{pmol}/\mu\text{l}$), der 18S-RNA_RT-Primer wurde mit $0,2 \times \text{TE pH } 8,0$ und RNasin versetzt (Endkonzentration $0,5\mu\text{g}/\mu\text{l}$) und bei -20°C gelagert.

Einen Überblick zu Primersequenzen, Annealing Temperatur und Produktlänge gibt nachfolgende Tabelle.

Name	Sequenz 5'-----3'	Annealing Temperatur	Produktlänge	Gene Accession No.
ChAT	forward: CAA CCA TCT TCT GGC ACT GA reverse: TAG CAG GCT CAA TAG CCA TT	60,0°C 60,0°C	183 bp	XM_224626
ChT1	forward: CAA GAC CAA GGA GGA AGC AG reverse: GCA AAC ATG GAA CTT GTC GA	60,0°C 60,0°C	150 bp	AB030947
VACHT	forward: GCC ACA TCG TTC ACT CTC TTG reverse: CGG TTC ATC AAG CAA CAC ATC	60,0°C 60,0°C	149 bp	X80395
OCT2	forward: GCC TCC TGA TCC TGG CTG reverse: GGT GTC AGG TTC TGA AGA GAG	60,5°C 59,8°C	226 bp	X98334
OCT3	forward: TTC GGC GTT GGC ATC ACG reverse: CTG TAA CTG TGA TCT CTG AG	58,2°C 55,3°C	421 bp	NM_019230
OCT2	forward: ATC ACG CCT TTC CTC GTC TA reverse: CTG CAT ATT CTC GGC ATC CT	57,3°C 57,3°C	162 bp	NM_031584
OCT3	forward: CAA TGG GAA ACA CCT CTC GT reverse: ATA CAC CAC GGC ACT TGT GA	57,3°C 57,3°C	154 bp	NM_019230
nAChRα4	forward: GGA CCC TGG TGA CTA CGA GA reverse: CAT AGA ACA GGT GGG CCT TG	60,0°C 60,0°C	137 bp	NM_024354
nAChRα7	forward: ACA TTG ACG TTC GCT GGT TC reverse: CTA CGG CGC ATG GTT ACT GT	60,0°C 60,0°C	235 bp	L31619
GAPDH	forward: CAT TGT TGC CAT CAA CGA CC reverse: TCA CAC CCA TCA CAA ACA TG	57,3°C 55,3°C	320 bp	NM_017008
18S-rRNA	forward: GGG AGG TAG TGA CGA AAA ATA ACA AT reverse: TTG CCC TCC AAT GGA TCC T RT: GAG CTG GAA TTA CCG CGG CT	60,1°C 56,7°C	101bp	M11188

Tab. 2-1: Übersicht der für die RT-PCR verwendeten Primerpaare.

2.1.7 Antikörper (Immunfluoreszenz)

Alle Antikörper zum immunfluoreszenzmikroskopischen Nachweis der Komponenten des cholinergen Systems im Hoden wurden ebenfalls von der Arbeitsgruppe Kardiopulmonale Neurobiologie unter der Leitung von Prof. Dr. Kummer bereitgestellt.

Primärantikörper	Hersteller
Kaninchen anti-Ratte OCT2	Alpha Diagnostic Intl.Inc., San Antonio, USA
Ratte OCT2 Kontrollpeptid	Alpha Diagnostic Intl.Inc., San Antonio, USA
Kaninchen anti-Ratte OCT3 IgG#1	Alpha Diagnostic Intl.Inc., San Antonio, USA
Ratte OCT3 Kontrollpeptid	Alpha Diagnostic Intl.Inc., San Antonio, USA
VACHT Ziege Antiserum	BIOTREND Chemikalien GmbH, Köln
Kaninchen anti-Ratte VACHT	Phoenix Pharmaceuticals, Inc., Belmont, USA

Die Primärantikörper Kaninchen anti-Ratte ChT1 und ChAT wurden durch Peptid-Immunisierung von Kaninchen hergestellt (Lips et al., 2002; Pfeil et al., 2004). Die Peptide dienten auch zur Präabsorptionskontrolle.

Folgende Sekundärantikörper fanden Verwendung:

Sekundärantikörper	Hersteller
Esel anti-Kaninchen IgG Cy3 konjugiert	CHEMICON International, Inc., Temecula, Kanada
Maus monoklonal anti-Ziege IgG, Klon GT-34 FITC konjugiert	SIGMA-ALDRICH, Inc., Saint Louis, USA

2.1.8 Zellen

Die RNA folgender, aus dem Hoden der Ratte isolierter Zellen wurde von Charles Pineau, GERM-INSERM, Université de Rennes, Frankreich, zur Verfügung gestellt: Leydig-Zellen, Peritubulär-Zellen, Sertoli-Zellen, Spermatogonien, Pachytän-Spermatozyten, runde Spermatisiden, Residualkörperchen. Die RNA-Isolierung erfolgte wie beschrieben (Guillaume et al., 2001).

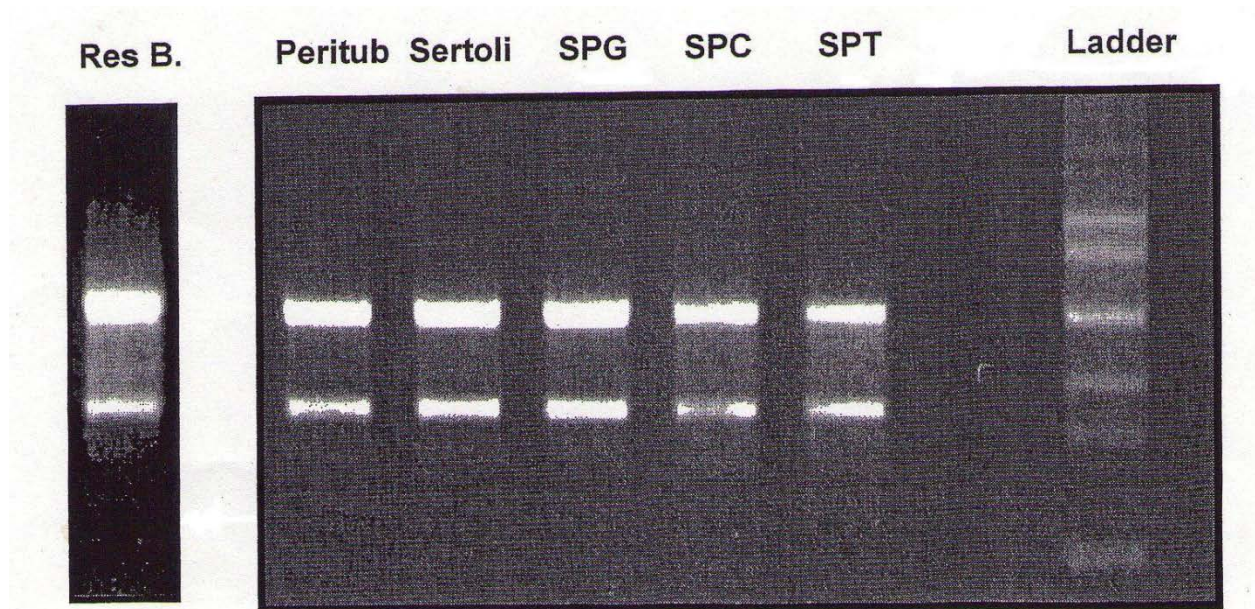


Abb. 2-1: RNA-Gelelektrophorese testikulärer Zellen (nach Charles Pineau). Res B.: Residualkörperchen. Peritub: Peritubulär-Zellen. Sertoli: Sertoli-Zellen. SPG: Spermatogonien. SPC: Pachytän-Spermatozyten. SPT: Runde Spermatiden. Ladder: Marker.

Die Reverse Transkription wurde von Sudhanshu Bushan (AG Meinhardt) durchgeführt und die cDNA für die Experimente zum non-neuronalen cholinergen System überlassen.

2.1.9 Versuchstiere

Als Versuchstiere dienten männliche Inzucht Wistar Ratten (Charles River Sulzfeld, Germany). Die Organentnahme und Tierversuche wurden vom Regierungspräsidium Gießen genehmigt (Aktenzeichen VI 63 – 19 c 20-15 (1) GI 20/23; V 54-19 c 20-15 c GI 20/23).

Für die Induktion der experimentellen Autoimmun-Orchitis (EAO) bzw. die Herstellung des Hodenhomogenats wurden Hoden von Ratten (200 g) ohne Hodenkapsel unter sterilen Bedingungen bei 4°C in einem gleichen Volumen isotoner Kochsalzlösung (500 mg/ml Nassgewicht) homogenisiert und bei -20°C gelagert. 30 Ratten mit einem Körpergewicht von 180-220 g wurden über eine intraperitoneale Gabe von 100 mg/kg KG Ketamin (Ketavet, Pharmacia GmbH, Erlangen, Germany) und 10 mg/kg KG Xylazin (Rompun, Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Germany) narkotisiert und anschließend mit 0,4 ml syngenen Hodenhomogenat immunisiert, welches einige Stunden zuvor mit 0,4 ml Freund's Adjuvans (Sigma-Aldrich, USA) versetzt/gemischt wurde. Die Immunisierung erfolgte dreimal jeweils im Abstand von 14 Tagen mit 0,8 ml/Ratte/Zeitpunkt subkutan in die hinteren Fußsohlen

und an verschiedenen Stellen des Rückens. Die Injektionsstellen an den Fußsohlen wurden mit Histoacryl® tissue glue (Braun, Tuttlingen, Germany) verschlossen. Nach den ersten beiden Immunisierungen wurden 10^{10} Zellen inaktiverter Bordetella pertussis Bakterien (DSMZ, Braunschweig, Germany) in 0,5 ml isotoner Kochsalzlösung in die Schwanzvene injiziert. Nach der dritten Immunisierung wurde eine intraperitoneale Injektion von 5×10^9 Zellen in 0,5 ml isotoner Kochsalzlösung (Doncel et al., 1989) verabreicht. Die Tiere der Kontrollgruppe (n=16) erhielten Freund's Adjuvans, welches Bordetella pertussis, aber kein Hodenhomogenat, enthielt. 50 und 80 Tage nach der ersten Immunisierung wurden die Tiere mit einer Überdosis Isofluran (FORENE®, Abbott, Wiesbaden, Germany) getötet. Die Hoden wurden unter sterilen Bedingungen entfernt, gewogen und entweder in flüssigem Stickstoff eingefroren oder in Bouin's Lösung für 12 h gelagert (Iosub, Inauguraldissertation 2005; Fijak et al., 2005; Iosub et al., 2006).

Da sich in den Experimenten eine statistisch signifikante Abnahme des Hodengewichts bei EAO-Tieren im Vergleich zu den Kontrolltieren mit Adjuvansbehandlung zeigte, können Hodenatrophie und Hodengewicht als Indikatoren für eine erfolgreiche Induktion der EAO angesehen werden (Fijak et al., 2005).

No.	Gewicht des Tieres (g)	Gewicht des Hodens (g)
5R (50 d EAO)	340	0,6
5L (50 d EAO)	340	0,6
9L (50 d EAO)	360	0,7
10R (50 d EAO)	352	0,6
10L (50 d EAO)	352	0,7
12L (50 d EAO)	357	0,7
Mittelwert		0,65 ($\pm 0,05$)
25L (80 d EAO)	400	0,8
26R (80 d EAO)	386	0,8
26L (80 d EAO)	386	0,6
28R (80 d EAO)	368	0,8
29L (80 d EAO)	400	0,8
30R (80 d EAO)	394	0,8
Mittelwert		0,77 ($\pm 0,08$)

No.	Gewicht des Tieres (g)	Gewicht des Hodens (g)
31R (50 d ADJ)	360	1,4
31L (50 d ADJ)	360	1,4
33L (50 d ADJ)	348	1,4
34L (50 d ADJ)	355	1,4
36R (50 d ADJ)	337	1,3
36L (50 d ADJ)	337	1,3
Mittelwert		1,37 ($\pm 0,05$)
38R (80 d ADJ)	394	1,5
41R (80 d ADJ)	404	1,4
41L (80 d ADJ)	404	1,3
42R (80 d ADJ)	400	1,5
44R (80 d ADJ)	380	1,4
44L (80 d ADJ)	380	1,4
Mittelwert		1,42 ($\pm 0,08$)

Tab. 2-2: Übersicht der verwendeten Versuchstiere mit Adjuvansbehandlung (ADJ) und EAO unter Angabe des Körper- und Hodengewichts (g) und des für das Hodengewicht berechneten Mittelwerts inkl. Standardabweichung. 50 d: 50 Tage nach 1. Immunisierung. 80 d: 80 Tage nach 1. Immunisierung. (nach M. Fijak).

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1 Gewebematerial

Unbehandelte männliche Wistar-Ratten (100 Tage alt, Charles River) wurden mit einer Überdosis Isofluran getötet. Nach Eröffnung des Bauchsitus wurden die Hoden unter semi-sterilen Bedingungen entnommen.

Die entnommenen Hoden wurden in Isopentan, welches zuvor in flüssigem Stickstoff gekühlt wurde, eingefroren und anschließend bei -80°C gelagert.

Durch einen Herzschnitt wurden die Tiere entblutet. Die Ratten wurden am Rücken weitgehend enthäutet, Muskeln mit einem Skalpell abgetrennt und der Kopf abgesetzt. Nach Eröffnung des Schädels mit einer Knochenschere wurde das Großhirn entnommen und in flüssigem Stickstoff sofort eingefroren.

Danach wurde vom Nacken kommend der Wirbelkanal mit einer Knochenschere vorsichtig eröffnet. Den Spinalnerven folgend, konnten die Spinalganglien vor den Foramina intervertebralia lokalisiert und herausgetrennt werden. Anschließend wurde das Rückenmark frei von Spinalnerven entnommen. Sowohl Spinalganglien als auch Rückenmark wurden entweder sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren oder zuerst in ein Eppendorf-Gefäß mit 350 µl RLT-Puffer (RNeasy Mini Kit, Qiagen) überführt und anschließend in flüssigem Stickstoff eingefroren. Es wurde beachtet, dass die komplette Präparationsdauer nicht mehr als 30 min betrug. Alle Proben wurden anschließend bei -80°C aufbewahrt.

2.2.1.2 RNA-Isolierung

Ribonukleasen (RNasen) sind sehr stabil und benötigen normalerweise keine Cofaktoren um aktiviert zu werden. Um einen Verdau der RNA durch ubiquitär vorkommende RNasen während der RNA-Isolierung zu vermeiden, wurde versucht ein weitgehend steriles Arbeiten zu gewährleisten. So wurden Handschuhe getragen, Einmal-Reaktionsgefäße aus Polypropylen und hitzesterilisierte Glaswaren verwendet und Geräte wie Elektrophoreseapparaturen, welche nicht sterilisiert werden konnten, für 30 min in 3%-ige Wasserstoffperoxid-Lösung eingelegt.

Von den bei -80°C tiefgefrorenen Hoden (EAO, ADJ, Kontrollen) wurden jeweils 100 mg Gewebe entnommen und in Eppendorf-Gefäße überführt. Je 100 mg Gewebe wurden mit 1 ml Trizol, einer monophasischen Lösung aus Phenol und Guanidinisothiocyanat, versetzt, mit zwei Keramik- oder Stahlkugeln 3-5 min auf höchster Stufe homogenisiert und anschließend für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Pro ml Trizol wurden nun 0,2 ml Phenolchloroform hinzugegeben und 20 sec gevortext. Nach der Zentrifugation von 10 min bei 13000 rpm und 4°C ließen sich drei Phasen unterscheiden: eine untere rote Phenol-Phase mit Proteinen, eine mittlere Phenol-Chloroform-Phase (Interphase) mit DNA und eine obere wässrige Phase mit RNA. Diese obere wässrige Phase wurde vorsichtig abgenommen (ca. 600-800 µl), in ein neues Eppendorf-Gefäß pipettiert und mit 0,2 ml Chloroform/ml Trizol versetzt. Nach weiterem kurzen Vortexen und 10 minütiger Zentrifugation bei 13000 rpm und 4°C wurde wiederum die obere wässrige Phase vorsichtig

abpipettiert (ca. 500 µl) und 1 Vol Chloroform hinzugegeben. Danach wurde, wie zuvor beschrieben, erneut gevortex und anschließend zentrifugiert, die obere wässrige Phase abgenommen und schließlich mit 0,5 ml eiskaltem Isopropanol/ml Trizol vorsichtig gemischt. Dann wurde die RNA für 30 min bei Raumtemperatur gefällt. Nach weiterer Zentrifugation (13000 rpm, 30 min, 4°C) befand sich das Präzipitat am Boden des Eppendorf-Gefäßes, so dass der Überstand dekantiert werden konnte. Das erhaltene RNA-Pellet wurde mit 200 µl eiskaltem 70%-igem Ethanol gewaschen, erneut 6 min bei 13000 rpm und 4°C zentrifugiert und nach vorsichtigem Abpipettieren des Ethanols bei Raumtemperatur luftgetrocknet. Nun wurde das RNA-Pellet in 50 µl H₂O (Aqua ad iniectabilia, Braun) mit 0,5 µl RNase-Inhibitor aufgenommen und durch mehrmaliges Aufziehen in eine Pipette vollständig resuspendiert. Eine spektralphotometrische Bestimmung der RNA-Konzentration schloss sich an. Die gewonnenen RNA-Proben wurden bei -80°C gelagert.

Ebenfalls nach diesem Protokoll wurde RNA aus Niere, Leber und Großhirn als Positivkontrollen isoliert. RNA weiterer Positivkontrollen wie Rückenmark und Spinalganglien wurde aufgrund der geringeren Gewebemenge mithilfe des RNeasy Mini Kits (Qiagen) nach Herstellerangaben gewonnen.

2.2.1.3 Spektralphotometrische Quantifizierung der isolierten RNA

Für die spektralphotometrische Bestimmung der Konzentration isolierter RNA wurde je Probe die Extinktion eines mit H₂O (Aqua ad iniectabilia, Braun) 1:50 verdünnten Aliquots bei den Wellenlängen 230 nm, 260 nm, 280 nm und 320 nm gemessen. Die Basen der Nukleinsäuren zeigen ihr Absorptionsmaximum bei $\lambda = 260$ nm, so dass die RNA-Konzentration mithilfe des Lambert-Beerschen Gesetzes $A = c \times d \times \epsilon$ (A = Absorption, c = Konzentration, d = Küvettendicke, ϵ = molarer Extinktionskoeffizient) bestimmt werden kann. Des Weiteren lässt sich mithilfe des Spektralphotometers auch der Reinheitsgrad angeben. Dieser wird aus dem Verhältnis der Extinktion von 260 nm zu 280 nm berechnet und sollte zwischen 1,5-2,0 liegen. Durch Verunreinigungen mit Proteinen oder Phenol steigt die Absorption bei 280 nm an, wodurch der Reinheitswert verringert wird.

2.2.1.4 RNA-Gelelektrophorese

Der Isolierung und spektralphotometrischen Quantifizierung schloss sich eine qualitative Gelelektrophorese der RNA an. Dabei wurde die isolierte RNA durch die Behandlung mit Formamid (im RNA-Probenpuffer) denaturiert und mithilfe der Elektrophorese durch ein Formaldehyd enthaltendes Agarosegel aufgetrennt. Im elektrischen Feld wandern die negativ geladenen RNA-Moleküle entsprechend ihrer Größe durch das Agarosegel in Richtung der positiv geladenen Anode.

Unter dem Abzug wurden zuerst Gelkammer, Gelträger und Kamm für mindestens 30 min mit 3% (v/v) H₂O₂ behandelt und vor dem direkten Gebrauch nochmals mit DEPC-Wasser ausgespült. Für das 1%-ige RNA-Agarosegel wurden 1,6 g (0,8 g) Agarose in 138 ml (69 ml) DEPC-Wasser bis zur vollständigen Lösung in der Mikrowelle aufgekocht. Sobald das Gemisch auf ca. 60°C abgekühlt war, wurden 8,2 ml (4,1 ml) Formaldehyd 37% und 16 ml (8 ml) 10×MOPS-Puffer hinzugefügt, gemischt und unter dem Abzug in die vorbereitete Gelkammer gegossen. Zur Bildung von Taschen im Gel wurde ein Kamm eingesetzt und das Gel getrocknet. Die Proben wurden auf ein Gesamtvolumen von 5 µl, bei einer Menge von 3 µg RNA absolut, mit Aqua ad iniectabilia aufgefüllt, mit 20 µl RNA-Probenpuffer versetzt und bei 70°C im Heizblock für 10 min denaturiert. Nach dem Abkühlen auf Eis und kurzer Zentrifugation wurden jeder Probe 1,5 µl Ethidiumbromid (0,3%) zugefügt. Ethidiumbromid lagert sich zwischen die Basen von Nukleinsäuren ein und verändert dadurch sein Absorptionsspektrum. Bei Anregung mit ultraviolettem Licht leuchtet Ethidiumbromid gebundene RNA sehr intensiv auf.

Das in den Laufpuffer 1×MOPS gelegte Gel wurde anschließend mit den fertigen Proben und einem RNA-Marker beladen und die Elektrophorese bei einer Spannung von 80 V gestartet. Nach der Elektrophorese wurde das Gel in der UV-Kammer betrachtet und das Ergebnis fotografisch mithilfe des Gel-Jet-Imager dokumentiert.

2.2.1.5 DNase-Verdau

Für den DNase-Verdau wurden die Proben, bei einer RNA-Menge von 5 µg absolut, nach folgendem Pipettierschema auf ein Gesamtvolumen von 20 µl gebracht:

μl für 5 μg	Aqua ad iniectabilia (μl)	DNase-10 \times Reaktionspuffer Promega (μl)	DNase Roche (μl)	Gesamtvolumen (μl)
\times	\times	2	2	20

Tab. 2-3: Zusammensetzung der Proben für die DNase-BehandlungI.

Zur Aktivierung der DNase wurden die Proben für 40 min bei 37°C, zur anschließenden Inaktivierung für weitere 10 min bei 72°C inkubiert. Danach wurden die Proben auf Eis gekühlt, zentrifugiert und bei -80°C gelagert.

Zur Überprüfung der erfolgreichen Durchführung des DNase-Verdaus wurde eine PCR für das „housekeeping gene“ GAPDH angefertigt. Kam es dabei zu keiner Amplifikation, so war der Verdau genomischer DNA vollständig.

Da allerdings bei der Anwendung dieses Protokolls auch nach mehrmaliger Wiederholung die Effizienz des DNase-Verdaus nicht zufriedenstellend war, wurde für weitere Experimente ein neues Protokoll erarbeitet und verwendet. Dafür wurde zunächst DEPC-H₂O angesetzt, über Nacht bei 37°C inkubiert und am nächsten Tag autoklaviert. Des Weiteren wurde ein alternativer 10 \times DNaseI-Puffer hergestellt. Die Menge der eingesetzten DNase orientierte sich an einem durchgeführten Testversuch, bei welchem 0,25 μl , 0,5 μl sowie 0,75 μl eingesetzt wurden, die sämtlich zu einem vollständigen Verdau geführt hatten. Diesmal wurden die Proben, bei einer RNA-Menge von 2,5 μg absolut, nach folgendem Pipettierschema auf ein Gesamtvolumen von 15 μl aufgefüllt:

μl für 2,5 μg	DEPC-H ₂ O (μl)	10 \times DNaseI- Puffer, laboreigene Herstellung (μl)	DNase Roche 10 U/ μl (μl)	Endvolumen (μl)
\times	\times	1,5	0,5	15

Tab. 2-4: Zusammensetzung der Proben für die DNase-BehandlungII.

Um die DNase zu aktivieren, folgte für 30 min eine Inkubation bei 37°C. Jede Probe wurde danach mit 3 μl 15 mM EDTA (pH 8,0) versetzt, um zweiwertige Kationen zu binden. Die

Inaktivierung der DNase erfolgte für 5 min bei 75°C. Nachdem alle Proben kurz auf Eis gekühlt und dann zentrifugiert wurden, wurde der DNase-Verdau mithilfe einer GAPDH-PCR überprüft.

2.2.1.6 Reverse-Transkription

Nach dem DNase-Verdau erfolgte die enzymatische Umschreibung der mRNA in cDNA mithilfe der reversen Transkriptase des Maus Moloney-Leukämie-Virus (M-MLV). Jeder Probe wurden 2 µl Oligo (dT)₁₅ Primer hinzugefügt, diese mit Aqua ad iniectabilia (Braun) auf 22 µl aufgefüllt und 10 min bei 70°C im Heizblock denaturiert. Danach wurden die Proben für mindestens 2 min auf Eis gestellt. Für die reverse Transkription wurde folgender Ansatz vorbereitet und zu den Proben gegeben:

M-MLV RT 5×Reaktionspuffer (µl)	dNTPs 10 mM (µl)	Rekombinanter RNasin® Ribonuklease Inhibitor 40 U/µl (µl)	Aqua ad iniectabilia (µl)	Endvolumen (µl)
8	2	1	7	18

Tab. 2-5: Zusammensetzung des Ansatzes für die reverse Transkription.

Dieser Ansatz (40 µl gesamt) wurde für 2 min bei 42°C vorgewärmt, anschließend 1 µl M-MLV reverse Transkriptase je Probe hinzupipettiert und alles für 50 min bei 42°C inkubiert. Die Deaktivierung der reversen Transkriptase erfolgte durch eine erneute Inkubation für 10 min bei 70°C. Anschließend wurden die Proben für mindestens 2 min auf Eis gelagert, zentrifugiert und das Ergebnis der Transkription mittels einer GAPDH-PCR überprüft. Die umgeschriebene cDNA wurde bei -20°C gelagert.

2.2.1.7 Qualitative PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion bietet die Möglichkeit mithilfe des Enzyms DNA-Polymerase eine spezifische DNA-Sequenz *in vitro* exponentiell zu amplifizieren.

Die qualitative PCR-Analyse in verschiedenen isolierten Zellen des Hodens der Ratte wurde nach folgendem Pipettierschema durchgeführt:

Template cDNA	1 µl
5×Reaktionspuffer	5 µl
dNTPs 10 mM	0,5 µl
MgCl ₂ 25 mM	1 µl
Primer 3'	0,25 µl
Primer 5'	0,25 µl
GoTaq Polymerase Promega (5 U/µl)	0,2 µl
Aqua ad iniectabilia	16,8 µl
TOTAL	25 µl

Tab. 2-6: Zusammensetzung eines einfachen Ansatzes für die qualitative PCR-Analyse in verschiedenen isolierten Zellen des Hodens der Ratte.

Die RT-PCR-Analyse in EAO- und Adjuvans-Kontrolltieren 50 und 80 Tage nach Behandlung sowie für GAPDH und 18S-rRNA erfolgte nach folgendem Schema:

Template cDNA	1 µl
10×Reaktionspuffer, laboreigenes Präparat	2,5 µl
dNTPs 10 mM	0,5 µl
MgCl ₂ 25 mM	1 µl
Primer 3'	0,25 µl
Primer 5'	0,25 µl
Taq Polymerase (2,5 U), laboreigenes Präparat	0,2 µl
Aqua ad iniectabilia	19,3 µl
TOTAL	25 µl

Tab. 2-7: Zusammensetzung eines einfachen Ansatzes für die RT-PCR-Analyse in EAO- und Adjuvans-Kontrolltieren 50 und 80 Tage nach Behandlung sowie die Kontrolle mittels GAPDH- und 18S-rRNA-PCR.

Die Programmabläufe der PTC 200 PCR-Maschine wurden spezifisch für die zu amplifizierenden Produkte wie folgt gewählt:

Programm	GAPDH, 18S-rRNA	ChAT, ChT1, VAcHT, nAChR α 4+7	OCT1+2	OCT3
Zyklenanzahl	30	40	40	40
Initiale Denaturierung	95°C für 2 min	96°C für 4 min	96°C für 4 min	96°C für 4 min
Denaturierung	95°C für 40 sec	94°C für 40 sec	94°C für 45 sec	94°C für 40 sec
„Annealing“	55°C für 30 sec	60°C für 30 sec	°C je nach Primer für 45 sec	57,3°C für 45 sec
Elongation	72°C für 30 sec	72°C für 30 sec	72°C für 45 sec	72°C für 45 sec
Abschließende Elongation	72°C für 10 min	72°C für 10 min	72°C für 10 min	72°C für 10 min
Lagerung bis zur Entnahme	4°C	4°C	10°C	10°C

Tab. 2-8: Temperatur- und Zeitprofil der RT-PCR-Programme.

2.2.1.8 DNA-Agarose-Gelelektrophorese

DNA-Fragmente werden durch die Agarose-Gelelektrophorese entsprechend ihrer Größe aufgetrennt. Die Geschwindigkeit der Auftrennung ist dabei abhängig von der molekularen Größe und Konformation der DNA, der Konzentration und dem Typ der für das Gel verwendeten Agarose, dem Gebrauch von Ethidiumbromid zur Anfärbung des Auftrags, dem Elektrophoresepuffer und dem angelegten elektrischen Feld.

Zur Herstellung 1,2-2%-iger Agarosegele wurde die entsprechende Menge an Agarose in einem Erlenmeyer-Kolben eingewogen, mit 1×TAE Puffer aufgefüllt und in der Mikrowelle aufgeköcht bis sie vollständig gelöst war. Nach dem Abkühlen auf ungefähr 60°C wurde Ethidiumbromid 0,1% hinzugefügt und alles durch vorsichtiges Schwenken vermischt.

Anschließend wurde die Lösung in eine Gelkammer gegossen, ein Kamm als Platzhalter zur Bildung der Taschen eingefügt und das Gel bei Raumtemperatur für 30-45 min bis zur vollständigen Polymerisierung getrocknet. Nach dem Erstarren des Gels wurde der Kamm vorsichtig entfernt und das Gel mit 1×TAE Elektrophoresepuffer übergossen.

Die Proben wurden nach beendeter PCR auf Eis gelagert und mit 0,1 Vol des 10×DNA-Probenpuffers gemischt. Dieser enthält Bromophenolblau und/oder Xylencyanol, wodurch der Verlauf der Elektrophorese kontrolliert werden kann. Bromophenolblau wandert im Agarose-Gel parallel zur DNA mit einer Größe von ca. 450 bp, so dass die Gelelektrophorese rechtzeitig beendet werden kann.

Nach der Einbringung der Proben und des 100 bp DNA-Markers in die Geltaschen wurde ein elektrisches Feld angelegt. Zu Beginn wurde, bis die Proben aus den Geltaschen ins Gel gewandert waren, eine geringere Spannung gewählt. Diese wurde später erhöht (max. 5 V/cm). Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel in der UV-Kammer betrachtet und das Ergebnis fotografisch mithilfe des Gel-Jet-Imager dokumentiert.

2.2.1.9 Co-Reverse-Transkription

Da für die quantitative RealTime PCR anstelle von GAPDH als „housekeeping gene“ 18S-rRNA Verwendung fand, wurde ein Protokoll für die reverse Transkription nach dem Vorbild von Zhu & Altmann (2005) entwickelt, welche die Umschreibung von rRNA und mRNA in cDNA in einem Schritt möglich macht.

Dafür wurden die 15 µl Endvolumen des DNase-Verdaus (2,5 µg RNA absolut) mit 2 µl Oligo (dT)₁₅ Primer (0,5 µg/µl), 2 µl 18S-rRNA-RT-Primer (0,5 µg/µl) und 3 µl Aqua ad iniectabilia (Braun) versetzt. Nach Denaturierung für 10 min bei 70°C und Abkühlung auf Eis für mindestens 2 min erfolgte das weitere Vorgehen gemäß des oben beschriebenen Protokolls der reversen Transkription. Zur Überprüfung der durchgeführten Co-RT wurde eine GAPDH-PCR und 18S-rRNA-PCR angefertigt.

2.2.1.10 Quantitative RealTime-PCR

Die RealTime-PCR dient der Expressionsanalyse von Genen, basierend auf dem Amplifikationsprinzip der qualitativen PCR, mit der zusätzlichen Möglichkeit der

Quantifizierung der vervielfältigten DNA. Die Quantifizierung erfolgt dabei über Fluoreszenzmessungen während der Elongation, am Ende eines jeden PCR-Zyklus. Dafür eignet sich die Nutzung interkalierender Farbstoffe wie z.B. SYBR Green. Diese binden an doppelsträngige DNA, wodurch ihre Fluoreszenz verstärkt wird. Mit zunehmender Amplifikation der DNA steigt proportional auch die Intensität der Fluoreszenz von Zyklus zu Zyklus an. Entscheidend ist die Bestimmung des Ct-Wertes, die Zahl des Zyklus, in dem die Fluoreszenz erstmalig signifikant die Hintergrund-Fluoreszenz übersteigt. Je größer die Menge der spezifischen cDNA im Gemisch, desto niedriger der Ct-Wert. Ein wichtiger Vorteil der RealTime-PCR ist die Tatsache, dass die Quantifizierung der DNA während der exponentiellen Phase der PCR, d.h. wenn optimale Reaktionsbedingungen vorliegen, stattfindet und so eine korrekte Messung erfolgen kann. Für die Quantifizierung wird außerdem ein Referenz-Gen jeder Probe mitgemessen, in diesem Fall 18S-rRNA, um einen relativen Mengenvergleich unabhängig von Schwankungen der eingesetzten Gesamt-cDNA durchführen zu können (relative Quantifizierung). Die Rohdaten liegen in Form der Ct-Werte für das gesuchte Gen und das Referenz-Gen vor. Die relative Expression wurde mit folgender Formel berechnet:

$$RE = 2^{-(\Delta Ct_{C_0} - \Delta Ct_{Probe})}$$

ΔCt = Ct des gesuchten Gens – Ct des Referenz-Gens, C_0 = unbehandelter Kontrollhoden,

C_{Probe} = Hoden von EAO und ADJ-Kontrolltieren 50 und 80 Tage nach Behandlung

Für alle Versuche wurde iQTM SYBR[®] Green Supermix in folgendem Ansatz verwendet:

Template cDNA	1 µl
iQ TM 2×SYBR [®] Green Supermix	12,5 µl
Primer 3'	0,5 µl
Primer 5'	0,5 µl
H ₂ O Ampuwa	10,5 µl
TOTAL	25 µl

Tab. 2-9: Zusammensetzung eines einfachen Ansatzes für die RealTime-qRT-PCR-Analyse.

Die Programme wurden wie unter 2.2.1.7 beschrieben gewählt.

Zur Vorbereitung der RealTime-PCR wurde ein Testlauf aller Primer (ChAT, ChT1, VACHT, OCT1-3, nAChR α 4+7, 18S-rRNA) in Zweifach-Bestimmung durchgeführt. Beim Vergleich der Ct-Werte fiel für 18S-rRNA ein sehr niedriger Ct-Wert auf. Daraufhin wurden neben unverdünnten Proben, verschiedene Verdünnungen und Volumina getestet, um die passende Konzentration der Ausgangs-DNA für 18S-rRNA zu finden. Im Rahmen von Verdünnungsreihen zeigte sich eine Konzentration von 1:1000 als am besten geeignet. Außerdem wurde die Pipettiergenauigkeit und damit Reproduzierbarkeit der Verdünnung überprüft.

Da immer wieder leichte Kontaminationen in der Negativkontrolle von 18S-rRNA auffielen, wurde die Anwendung einer UV-Bestrahlung in Betracht gezogen. Sarkar & Sommer (1990a+b, 1991, 1993) hatten bereits gezeigt, dass eine Eliminierung kontaminierender DNA durch UV-Licht möglich ist. Zur Etablierung dieser Methode wurden verschiedene Vorversuche durchgeführt. Zum einen wurden Ansätze für Positiv- und Negativkontrollen mit und ohne 8-MOP in DMSO hergestellt, zum anderen wurden diese vor Zugabe der Template cDNA unterschiedlich lange (0, 1, 5 oder 15 min) mit UV-Licht bestrahlt. Die Effektivität der UV-Bestrahlung zeigte sich dabei unabhängig von der Zugabe von 8-MOP. Eine 5 minütige Bestrahlung hatte bereits einen supprimierenden Effekt auf die Amplifikation der cDNA in der Positivkontrolle, nach 15 min konnte überhaupt keine cDNA mehr nachgewiesen werden. Auf diesen Daten basierend wurden bei allen durchgeführten RealTime-PCRs die pipettierten Ansätze vor Zugabe der Template cDNA 3 min mit UV-Licht bestrahlt, um eine Kontamination und somit Amplifikation von Fremd-DNA zu vermeiden.

Um eine etwaige Pipettierungenauigkeit auszugleichen, erfolgte stets eine Dreifach-Bestimmung jeder Probe. Durch eine vom iCycler erstellte Schmelzkurvenanalyse nach abgeschlossener PCR wurde die Fragmentlänge und Spezifität des amplifizierten Produkts überprüft. Die Höhe des Peaks der Schmelzkurve zeigt ungefähr die Menge des Amplikons an. Abschließend wurden auch die Proben der RealTime-PCR per Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt.

2.2.2 Morphologische Methoden

2.2.2.1 Gewebematerial

Eine weibliche Wistar-Ratte (ca. 6-8 Wochen alt) wurde mit einer Überdosis Isofluran getötet und anschließend Trachea, Thorax, M. biceps, Speicheldrüse, Leber, Niere, Rückenmark und Spinalganglien für mögliche Positivkontrollen entnommen. Die Organe bzw. Gewebe wurden in Isopentan, welches zuvor in flüssigem Stickstoff gekühlt wurde, getaucht und in Tissue Tek eingebettet. Des Weiteren wurden auch bereits bei -80°C eingefrorene Hoden von Kontroll-, Adjuvans- und EAO-Tieren mit Tissue Tek für die Herstellung von Kryostatschnitten vorbereitet.

2.2.2.2 Herstellung von Kryostatschnitten

Das in Tissue Tek eingebettete Gewebe wurde je nach Gewebeart bei bestimmter Temperatur (Hoden bei -17/-18°C, Trachea und Thorax als Positivkontrollen bei -20°C) geschnitten. Die 10 µm dicken Schnitte wurden anschließend auf mit Poly-L-Lysin beschichtete Objektträger aufgebracht. Je nach Antikörper wurden die Objektträger entweder 10 min bei -20°C mit Aceton (für OCT2+3) oder 20 min bei Raumtemperatur mit Zamboni (für ChAT, ChT1, VACht) fixiert. Nach der Fixierung mit Aceton wurden die Objektträger 30-60 min getrocknet. Die Fixierung mit Zamboni erforderte zweimal ein 10 minütiges Waschen mit PBS und danach ein kurzes Spülen mit Aqua dest., um eine Bildung von Salzkristallen durch PBS zu vermeiden. Danach wurden Zamboni-fixierte Objektträger 1 h mit Histo-Block-Lösung, Aceton-fixierte mit 50%-igem Pferde-Serum geblockt, um unspezifische und somit unerwünschte Bindungsstellen abzusättigen.

2.2.2.3 Immunfluoreszenz

Sowohl Primär- als auch Sekundärantikörper wurden entsprechend der benötigten Verdünnung mit dem Puffer PBS+S versetzt.

Primärantikörper	Verdünnung
OCT2 Kaninchen-anti-Ratte	1:400
OCT3 Kaninchen-anti-Ratte	1:400
VACHT Ziege	1:1000
VACHT Kaninchen-anti-Ratte	1:200
ChTVIb Kaninchen1 115.Tag	1:16000
cChAT Kaninchen2 90.Tag	1:8000
Sekundärantikörper	
Esel-anti-Kaninchen Cy3	1:1000
Maus-anti-Ziege FITC	1:200

Nach Absaugen der Absättigungslösung wurden 100 µl Primärantikörper pro Objektträger aufgetragen und über Nacht bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Bei den Negativkontrollen wurde hingegen statt des Primärantikörpers PBS+S verwendet. Ansonsten wurde genauso verfahren wie mit den übrigen Proben. Des Weiteren wurden Präabsorptionskontrollen für ChT1 und OCT2+3 angefertigt, ChAT- und VACHT-Peptide waren nicht vorhanden. Dazu wurden 20 µg Peptid pro 100 µl Antikörper eingesetzt. Peptid und Antikörper wurden zusammen einige Stunden bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend anstelle des Primärantikörpers aufgebracht. Der restliche Ablauf erfolgte nach dem im nächsten Abschnitt beschriebenen Protokoll.

Am folgenden Tag wurde der Primärantikörper abgesaugt und die Objektträger zweimal 10 min mit PBS gewaschen. Nach Entfernung des PBS wurden die Schnitte mit je 100 µl Sekundärantikörper 1 h im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Da der Sekundärantikörper lichtempfindlich ist, wurden auch alle folgenden Schritte im Dunkeln durchgeführt. Als nächstes wurde der Sekundärantikörper abgesaugt und es folgte zweimal ein 5-10 minütiges Waschen mit PBS. Daran schloss sich die Nachfixierung mit PFA 4% für 10 min an, um eine stärkere Antigen-Antikörper-Bindung und somit eine Immobilisierung zu erreichen und eine Diffusion und Hofbildung zu vermeiden. Abschließend wurden die Objektträger noch zweimal für 10 min mit PBS gewaschen, dieses abgesaugt und die Schnitte mit gepuffertem Glycerol oder alternativ zur Darstellung von Zellkernen mit DAPI

eingedeckelt. Mit der Auswertung am Fluoreszenzmikroskop wurde mindestens $\frac{1}{2}$ -1 h gewartet, bis das Glycerol oder DAPI ins Gewebe eingedrungen war. Die anschließende Auswertung am Fluoreszenzmikroskop mit entsprechenden Filtern erfolgte per Fotodokumentation. Die fertigen Immunfluoreszenzschnitte wurden bei +4°C dunkel im Kühlschrank aufbewahrt.

3. Ergebnisse

3.1 ChAT im Hoden der Ratte

3.1.1 Nachweis von ChAT in testikulären Zellen

Bei der Untersuchung verschiedener isolierter Zellen des Hodens konnte mittels RT-PCR-Analyse nach Normalisierung der Daten gezeigt werden, dass die ChAT mRNA besonders stark in mittleren und späten Keimzellstadien wie Pachytän-Spermatozyten und runden Spermatiden exprimiert wird. Aber auch das nach der Spermiation in Form von Residualkörpern zurückbleibende Zytoplasma der Spermatiden wies noch einen gewissen Gehalt an ChAT mRNA auf. Interessanterweise fand sich in den frühen Keimzellstadien (Spermatogonien) kein Nachweis für ChAT. In interstitiellen Zellen war ChAT in nur sehr geringem Maß exprimiert. Als Positivkontrolle (+) für ChAT diente Großhirn, in der Negativkontrolle (-) wurde bei sonst gleicher Zusammensetzung des PCR-Ansatzes anstelle von cDNA Aqua ad iniectabilia verwendet. Für die Normalisierung wurde mithilfe des Programms Quantity One, Version 4.5.0, 1D-Analysis Software (BIO-Rad Laboratories, München) die Bandenintensität von ChAT und GAPDH gemessen, in Relation zueinander gesetzt und graphisch dargestellt.

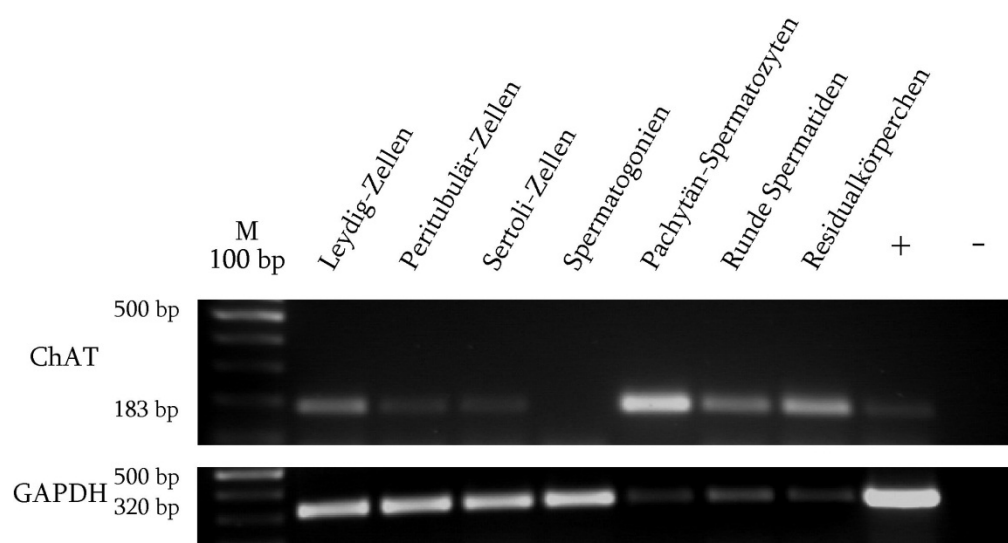


Abb. 3-1: Qualitativer Nachweis der ChAT mRNA Expression mittels RT-PCR-Analyse in verschiedenen isolierten Zellen des Hodens der Ratte. Die GAPDH mRNA Expression wird als Kontrolle für einen gleichmäßigen Probenaufrag verwendet. M: Marker. bp: Basenpaare. Positivkontrolle (+): Großhirn. Negativkontrolle (-): Ansatz ohne cDNA.

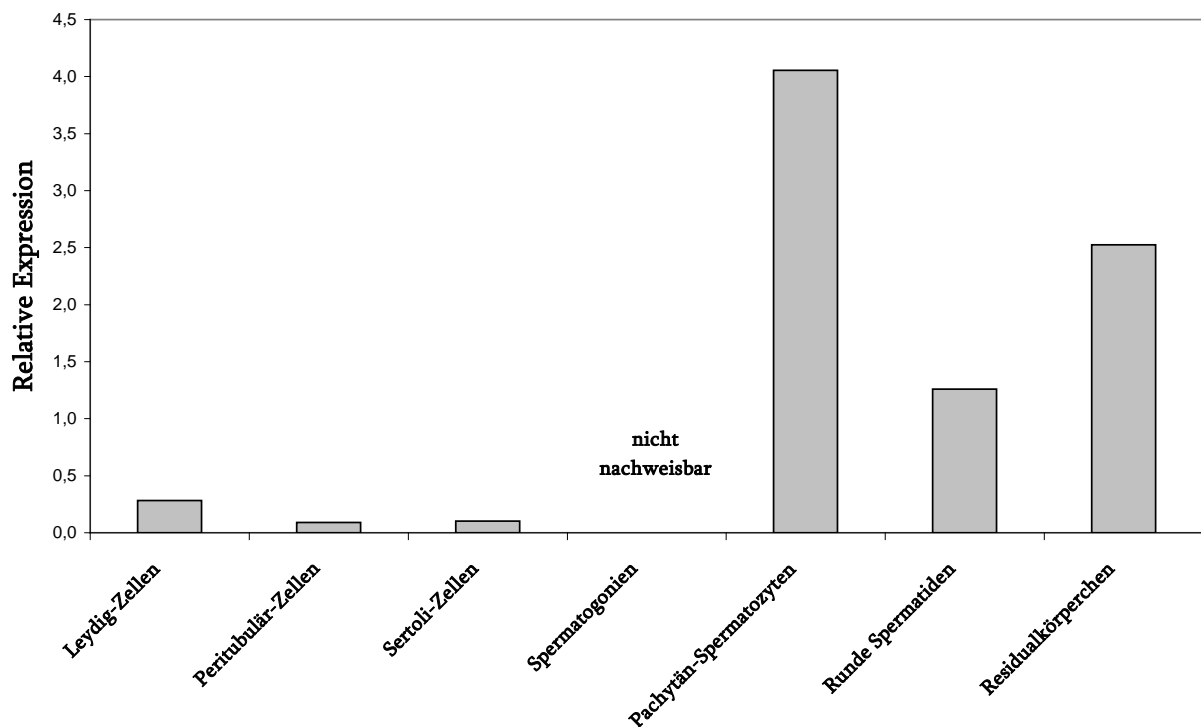


Abb. 3-2: Semiquantitativer Nachweis der ChAT mRNA Expression in verschiedenen isolierten Zellen des Hodens der Ratte nach Normalisierung der RT-PCR-Daten.

3.1.2 Immunfluoreszenzmikroskopischer Nachweis von ChAT

Neben der Analyse der ChAT mRNA wurde mit Immunfluoreszenz an Kryostatschnitten von Hoden auch der Nachweis auf Proteinebene durchgeführt. Als Positivkontrolle (A) dienten hierbei Zellen des respiratorischen Epithels der Trachea (>), für die Negativkontrolle (B) wurde bei sonst gleichem Protokoll der Primärantikörper durch PBS+S ersetzt.

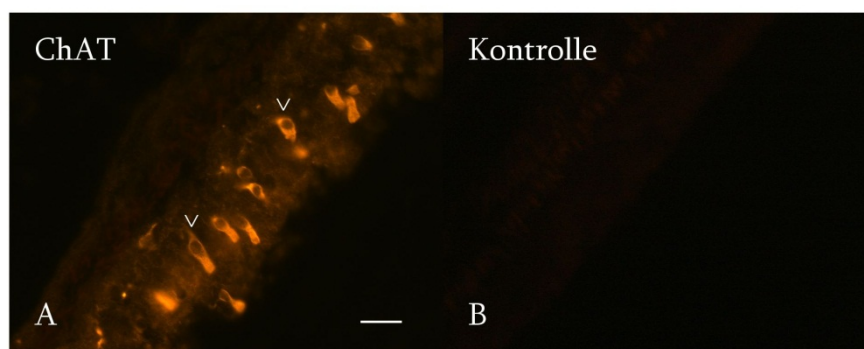


Abb. 3-3: Immunfluoreszenzmikroskopischer Nachweis von ChAT in der Trachea der Ratte als Positivkontrolle (A). Hier reagieren Zellen des respiratorischen Epithels der Trachea (>). Negativkontrolle: Weglassen des Primärantikörpers (B). Maßstab: 20 μ m.

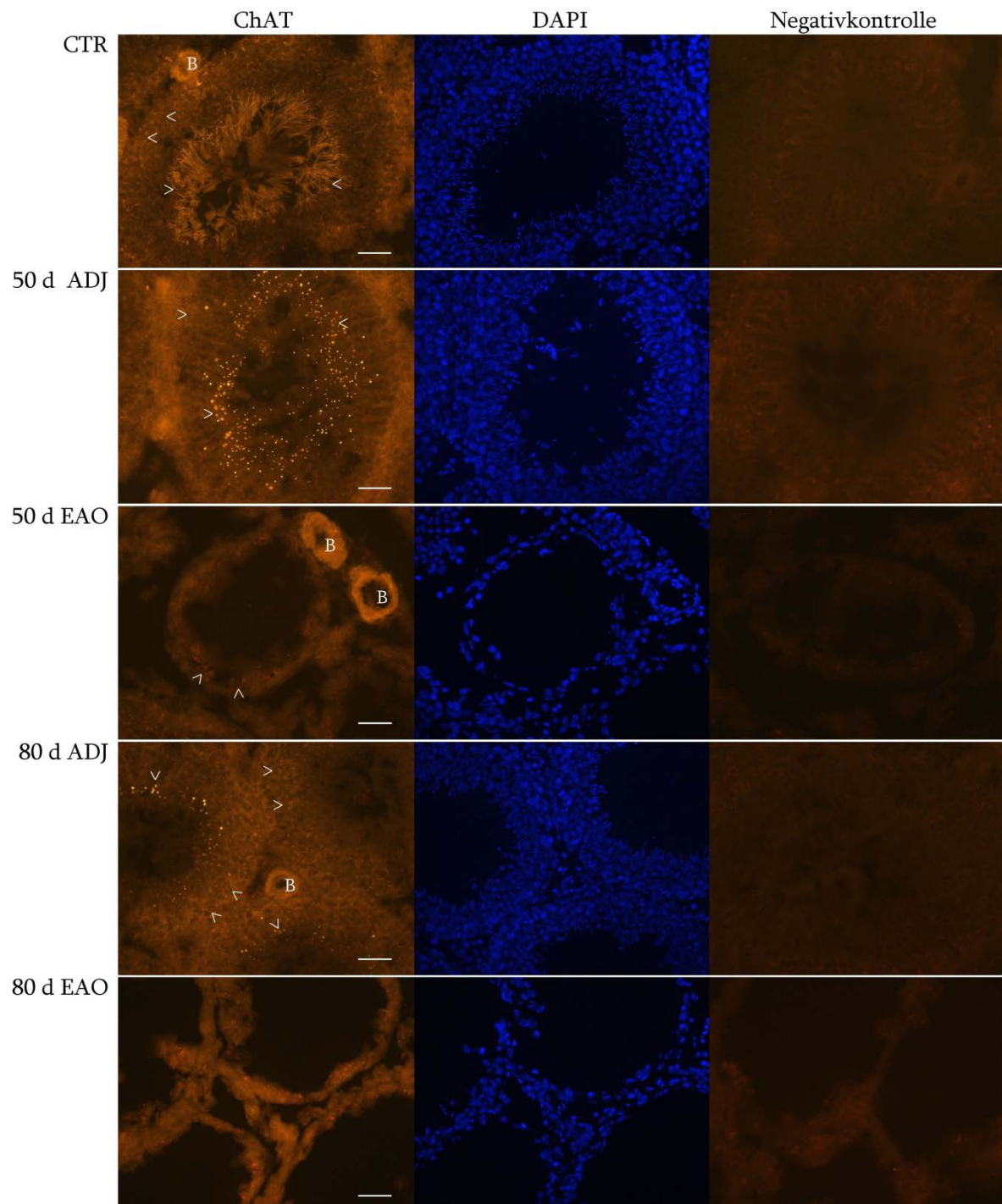


Abb. 3-4: Immunfluoreszenzmikroskopischer Nachweis von ChAT im Hoden von unbehandelten (CTR), EAO- und Adjuvans-Kontrolltieren (ADJ) 50 und 80 Tage (d) nach Behandlung. Anfärbung der Zellkerne mit DAPI und Darstellung der Negativkontrollen (Weglassen des Primärantikörpers). Als ChAT-positiv (>) zeigen sich hier meiotische Pachytänspermatozyten, Residualkörperchen sowie Spermienschwänze kurz vor der Spermiation. Positiv, jedoch nur schwach, sind auch Sertoli-Zellen. In 50 d ADJ zeigen sich Sertoli-Zellen, Pachytän-Spermatozyten, runde Spermatiden, Residualkörperchen und Blutgefäße (B), in 50 d EAO Pachytän-Spermatozyten, Sertoli-Zellen und Gefäße, in 80 d ADJ runde und elongierte Spermatiden und kleine Gefäße für ChAT positiv. Maßstab: 50 µm.

Immunfluoreszenzmikroskopisch konnten die bereits mit der RT-PCR-Analyse an isolierten Zellen des Hodens festgestellten Ergebnisse bestätigt werden. So waren auch hier in den Schnitten der unbehandelten Rattenhoden meiotische Pachytän-Spermatozyten, Residualkörperchen und Spermischwänze ChAT-positiv. Von den übrigen Zellen zeigten im Mikroskop jedoch nur Sertoli-Zellen eine schwach positive Reaktion. In den Schnitten der Adjuvans-Kontrolltiere 50 Tage nach Behandlung waren Sertoli-Zellen, Pachytän-Spermatozyten, runde Spermatiden und Residualkörperchen positiv. Dagegen war der Nachweis von ChAT in den Schnitten der EAO-Kontrolltiere 50 Tage nach Behandlung nur noch in Sertoli-Zellen und einigen Pachytän-Spermatozyten möglich, was durch den Verlust an Keimzellen im Orchitishoden erklärt werden kann.

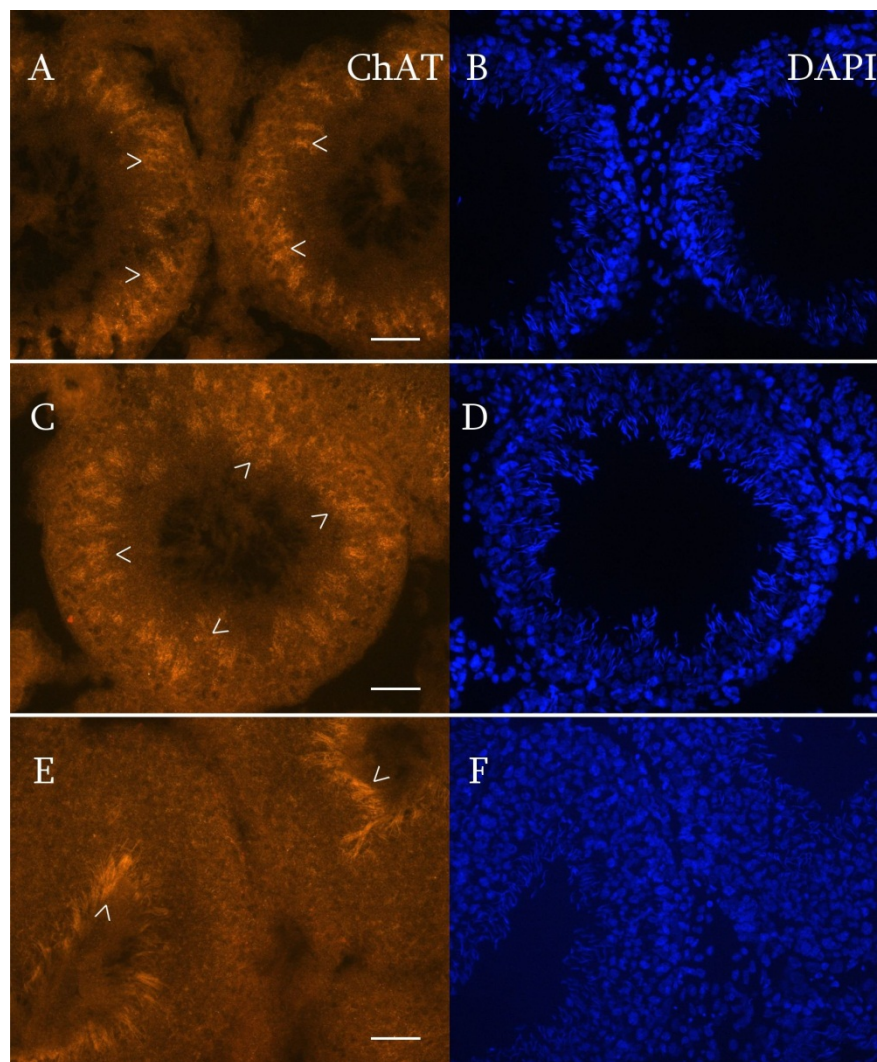


Abb. 3-5: Immunfluoreszenzmikroskopischer Nachweis von ChAT im Hoden von ADJ-Kontrolltieren 80 Tage nach Behandlung (A+C+E). Anfärbung der Zellkerne mit DAPI (B+D+F). In den dargestellten Hodenschnitten sind verschiedene Stadien der Spermatogenese zu erkennen. ChAT ist in den runden und elongierten Spermatiden lokalisiert (>). Maßstab: 50 μ m.

In den Adjuvans-Kontrolltieren 80 Tage nach Behandlung fielen besonders die späten Keimzellstadien als ChAT positiv auf. Entsprechend ihrer Lokalisation konnten vor allem runde und elongierte Spermatiden identifiziert werden. Je weiter die Spermatogenese fortschreitet, desto näher am Lumen befinden sich die zu Spermien heranreifenden Keimzellen.

In EAO-Hoden 80 Tage nach Behandlung war ChAT in Gefäßen und Lymphfollikeln lokalisiert. Unabhängig von Art und Dauer der Behandlung war stets eine positive Reaktion für ChAT in Gefäßen zu erkennen.

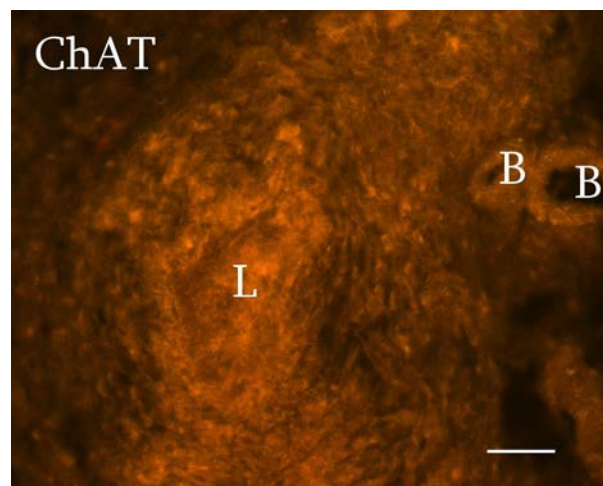


Abb. 3-6: Immunfluoreszenzmikroskopischer Nachweis von ChAT in EAO-Hoden 80 Tage nach Behandlung. Es sind ChAT positive Zellen in einem und um einen Lymphfollikel (L) sowie in Blutgefäßen (B) erkennbar. Maßstab: 50 µm.

3.1.3 Vergleich der ChAT mRNA Expression in EAO- und Adjuvans-Kontrolltieren

Es konnte gezeigt werden, dass die Adjuvansbehandlung weder nach 50 noch nach 80 Tagen einen signifikanten Einfluss auf die mRNA Expression von ChAT hatte. Im Gegensatz dazu wurde aber bei den EAO-Ratten sowohl nach 50 als auch nach 80 Tagen eine Abnahme der Expression beobachtet.

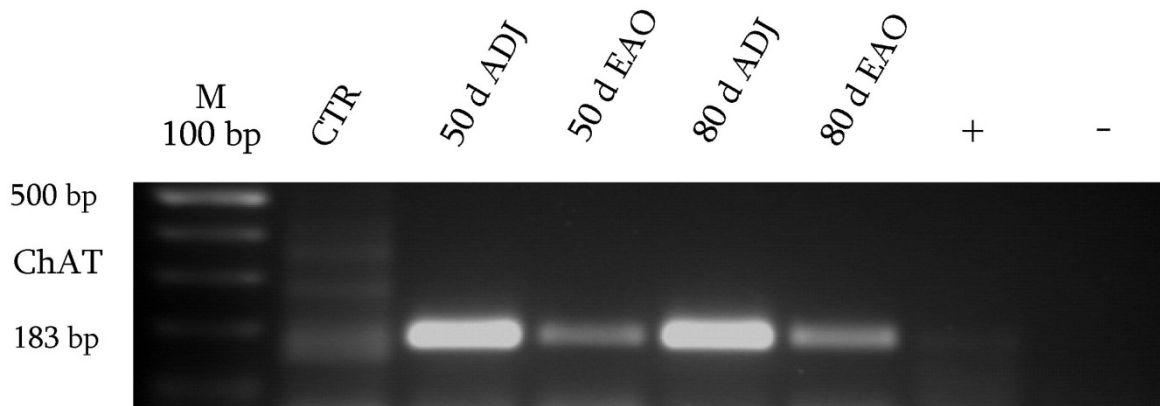


Abb. 3-7: Qualitativer Nachweis der ChAT mRNA Expression mittels RT-PCR-Analyse im Hoden von unbehandelten (CTR), EAO- und Adjuvans-Kontrolltieren (ADJ) 50 und 80 Tage (d) nach Behandlung. M: Marker. bp: Basenpaare. Positivkontrolle (+): Großhirn. Negativkontrolle (-): Ansatz ohne cDNA.

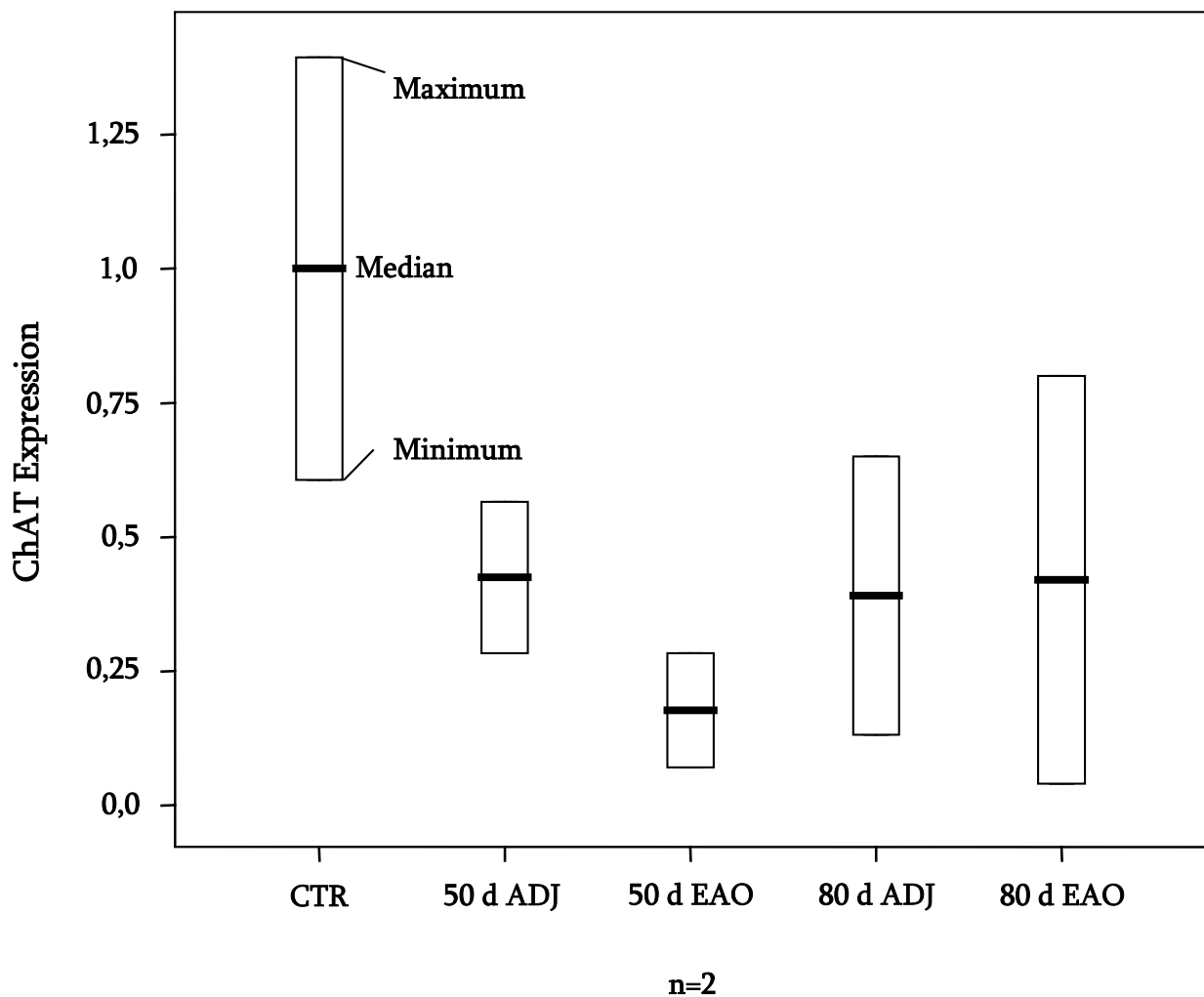


Abb. 3-8: Nachweis der ChAT mRNA Expression mittels qRT-PCR-Analyse im Hoden von unbehandelten (CTR), EAO- und Adjuvans-Kontrolltieren (ADJ) 50 und 80 Tage (d) nach Behandlung. n = Anzahl der Tiere pro Gruppe. Darstellung mit Maximum, Minimum und Median (dicke schwarze Linie).

Bei der qRT-PCR kam es mit einer Ausnahme (80 d EAO, Gruppe 1) ebenfalls zu einer starken Abnahme der Expression 50 und 80 Tage nach Auslösen einer Autoimmunorchitis. Allerdings zeigte auch die Adjuvansbehandlung im Gegensatz zur qualitativen RT-PCR einen supprimierenden Effekt. Da aufgrund unbefriedigender Schmelzkurvenverläufe nur mit der Hälfte der vorhandenen Proben (n=2) Versuche durchgeführt werden konnten, war eine statistische Auswertung mithilfe des Programms SPSS nicht möglich. Die relative Expression wurde (s. 2.2.1.10) berechnet und in einem Diagramm dargestellt.

3.2 ChT1 im Hoden der Ratte

3.2.1 Nachweis von ChT1 in testikulären Zellen

ChT1 war mittels RT-PCR-Analyse als einzige aller untersuchten Komponenten des non-neuronalen cholinergen Systems in jedem der isolierten Zelltypen des Hodens nachweisbar. Dabei zeigte ChT1 ein ähnliches Verteilungsmuster wie ChAT. So fand sich ChT1 mRNA besonders in Pachytän-Spermatozyten, runden Spermatiden und Residualkörperchen. Weitaus schwächer war die Expression in Spermatogonien, Sertoli- und Peritubulär-Zellen. Die Leydig-Zellen wiesen einen sehr geringen Gehalt an ChT1 mRNA auf. Als Positivkontrolle (+) für ChT1 diente, wie für ChAT, Großhirn, in der Negativkontrolle (-) wurde bei sonst gleicher Zusammensetzung des PCR-Ansatzes anstelle von cDNA Aqua ad iniectabilia verwendet. Für die Normalisierung wurde mithilfe des Programms Quantity One, Version 4.5.0, 1D-Analysis Software (BIO-Rad Laboratories, München) die Bandenintensität von ChT1 und GAPDH gemessen, in Relation zueinander gesetzt und graphisch dargestellt.

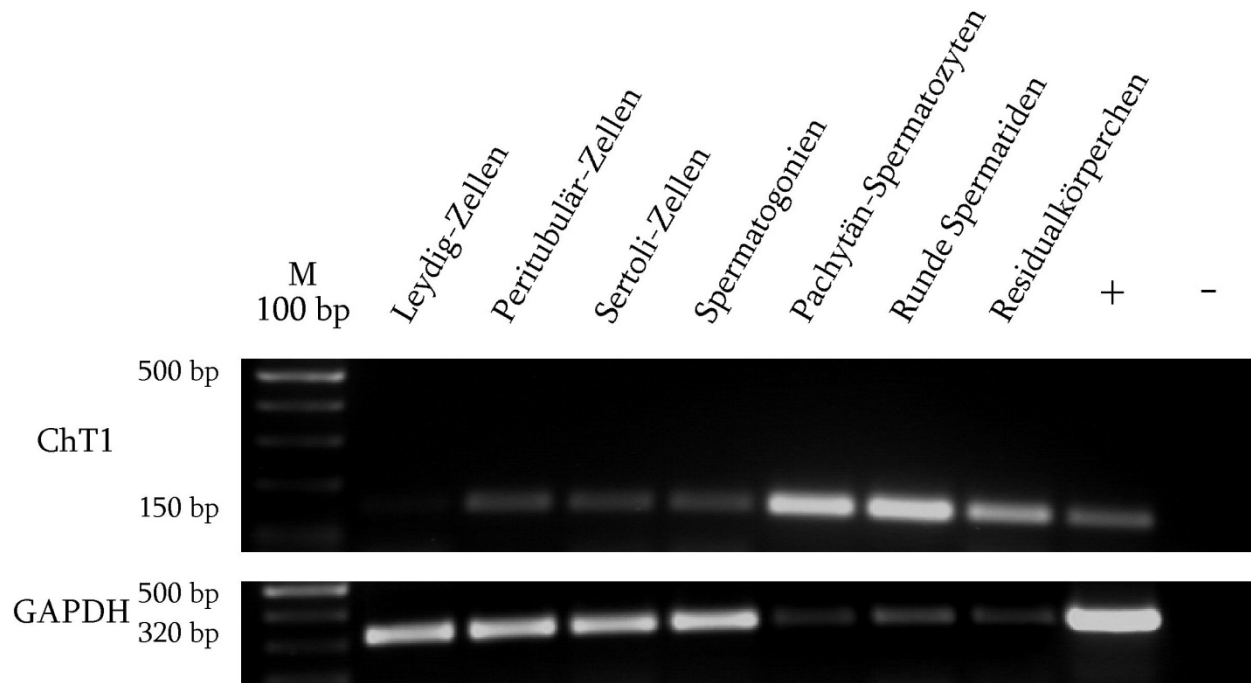


Abb. 3-9: Qualitativer Nachweis der ChT1 mRNA Expression mittels RT-PCR-Analyse in verschiedenen isolierten Zellen des Hodens der Ratte. Die GAPDH mRNA Expression wird als Kontrolle für einen gleichmäßigen Probenauftrag verwendet. M: Marker. bp: Basenpaare. Positivkontrolle (+): Großhirn. Negativkontrolle (-): Ansatz ohne cDNA.

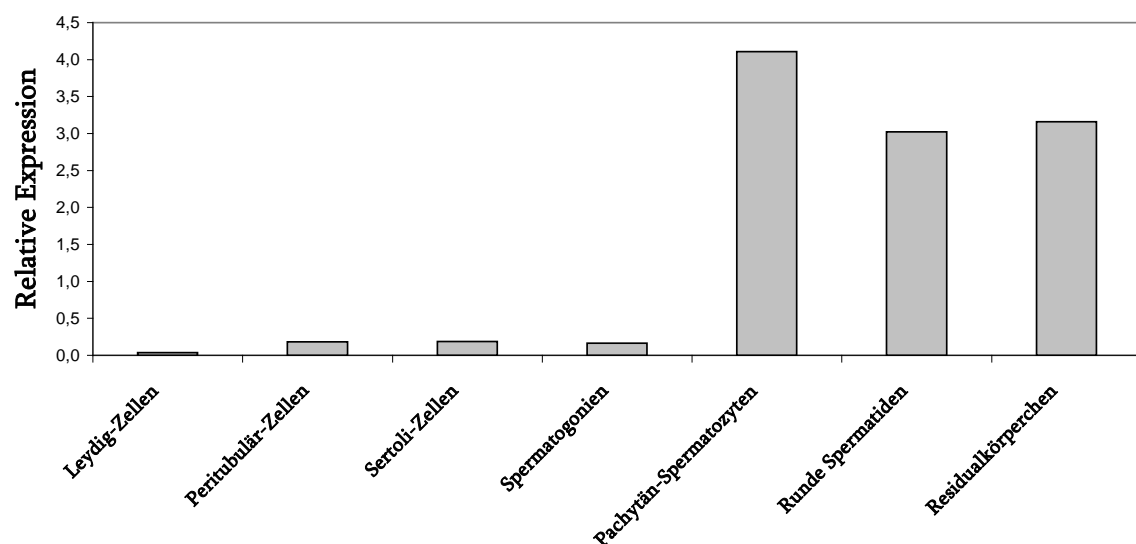


Abb. 3-10: Semiquantitativer Nachweis der ChT1 mRNA Expression in verschiedenen isolierten Zellen des Hodens der Ratte nach Normalisierung der RT-PCR-Daten.

3.2.2 Immunfluoreszenzmikroskopischer Nachweis von ChT1

Auch für die immunfluoreszenzmikroskopische Darstellung von ChT1 wurden Kryostatschnitte von Hoden angefertigt. Als Positivkontrolle diente wie bei ChAT Trachea, da die Zellen des respiratorischen Epithels ChT1 positiv sind. Bei der Negativkontrolle wurde der Primärantikörper weggelassen, für die Präabsorptionskontrolle der Primärantikörper mit einem immunogenen Peptid zuvor bei Raumtemperatur inkubiert.

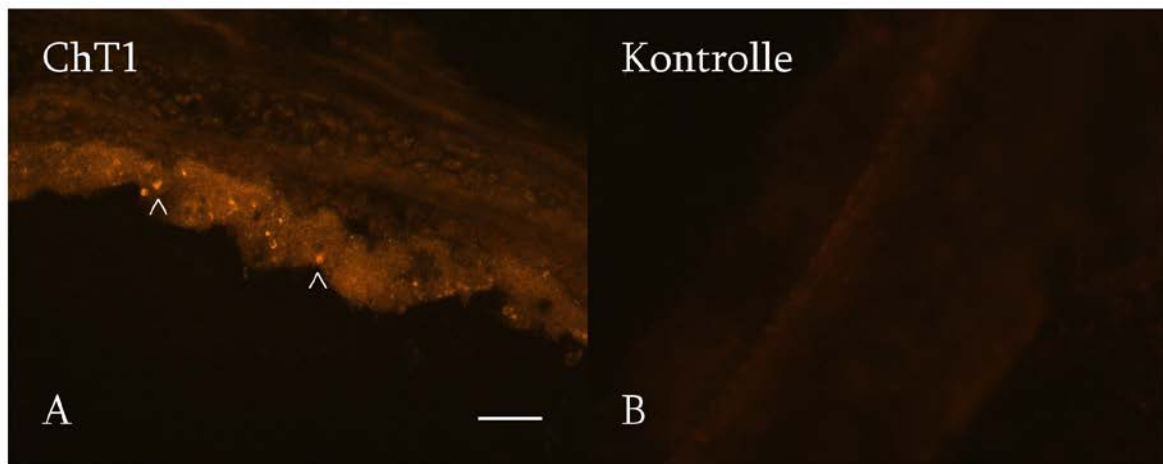


Abb. 3-11: Immunfluoreszenzmikroskopischer Nachweis von ChT1 in der Trachea der Ratte als Positivkontrolle (A). Es reagieren einzelne Zellen des respiratorischen Epithels (>). Negativkontrolle: Weglassen des Primärantikörpers (B). Maßstab: 50 μ m.

In der Immunfluoreszenz war ChT1 vor allem in den Zellen lokalisiert, welche in der RT-PCR-Analyse die höchste Expression gezeigt hatten. Dabei handelte es sich insbesondere um primäre Spermatozyten. In den Adjuvans-Kontrolltieren 50 Tage nach Behandlung konnten aber auch ChT1 positive Spermatogonien nachgewiesen werden. Problematisch war die Identifizierung der positiven Zellen in den Adjuvans-Kontrolltieren 80 Tage nach Behandlung, da die Zahl der positiven Zellen an der Basis der Tubuli für Sertoli-Zellen sprach, die Morphologie aber für primäre Spermatozyten charakteristisch war. Wird dieses Ergebnis mit dem der RT-PCR-Analyse verglichen, so dürfte es sich mit größerer Wahrscheinlichkeit um primäre Spermatozyten handeln.

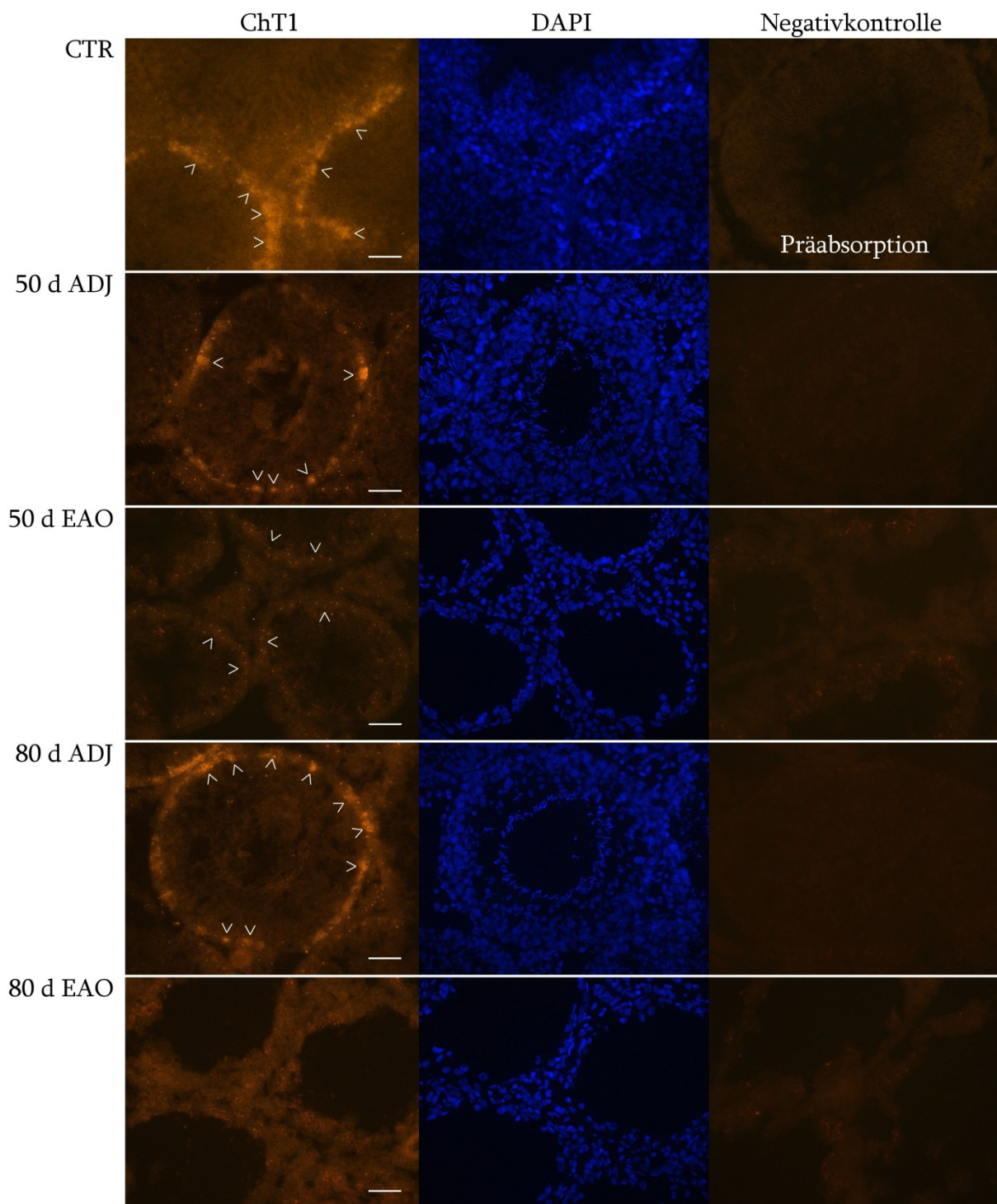


Abb. 3-12: Immunfluoreszenzmikroskopischer Nachweis von ChT1 im Hoden von unbehandelten (CTR), EAO- und Adjuvans-Kontrolltieren (ADJ) 50 und 80 Tage (d) nach Behandlung. Anfärbung der Zellkerne mit DAPI und Darstellung der Präabsorptionskontrolle (mit immunogenem Peptid präinkubierter Primärantikörper) bzw. Negativkontrollen (Weglassen des Primärantikörpers). In der unbehandelten Kontrolle zeigen sich Zellen im Keimepithel wie primäre Spermatozyten ChT1 positiv (>). In 50 d ADJ sind Spermatogonien und Spermatozyten, in 80 d ADJ primäre Spermatozyten zu erkennen. In den Orchitistieren finden sich 50 Tage nach Behandlung nur noch vereinzelte Zellen der Basis der Tubuli positiv, 80 Tage nach Behandlung sind keine ChT1 positiven Zellen mehr nachweisbar. Maßstab: 50 μ m.

Die Schnitte der Rattenhoden mit experimentell ausgelöster Autoimmunorchitis zeigten neben unspezifischen Bindungen entweder nur noch vereinzelt positive Zellen (50 Tage nach Behandlung) oder gar keine Reaktion in testikulären Zellen mehr (80 Tage nach Behandlung). Jedoch fand sich eine positive Reaktion für ChT1 in 80 d EAO, ähnlich wie bei ChAT, in Granulomen.

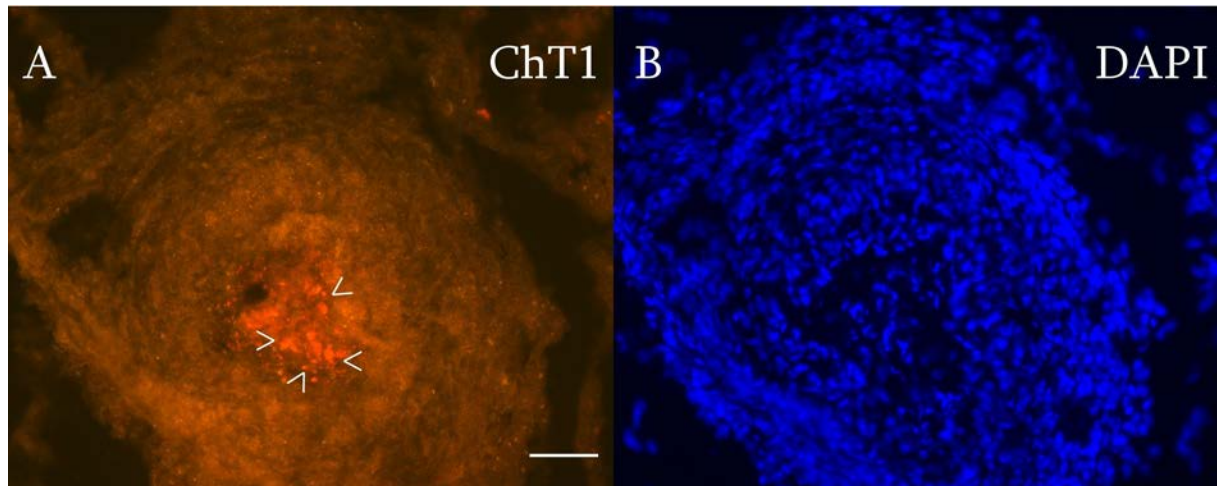


Abb. 3-13: Immunfluoreszenzmikroskopischer Nachweis von ChT1 im Hoden von Orchitistieren 80 Tage nach Behandlung (A). Es zeigt sich eine stark positive Reaktion in einem Granulom (>). Anfärbung der Zellkerne mit DAPI (B). Maßstab: 50 µm.

Bei der Mikroskopie der Schnitte im unbehandelten Hoden fiel auf, dass die positive Reaktion von ChT1 nicht in allen Tubuli seminiferi nachweisbar war. Nach genauerer Betrachtung zeigte sich, dass die einzelnen Tubuli in verschiedenen Stadien vorlagen (Abb. 3-14, A-D). So konnte ChT1 in Präleptotänspermatozyten der Tubuli ab Stadium VIII gefunden werden. Aus diesem Grund lässt sich eine stadienspezifische Expression von ChT1 postulieren.

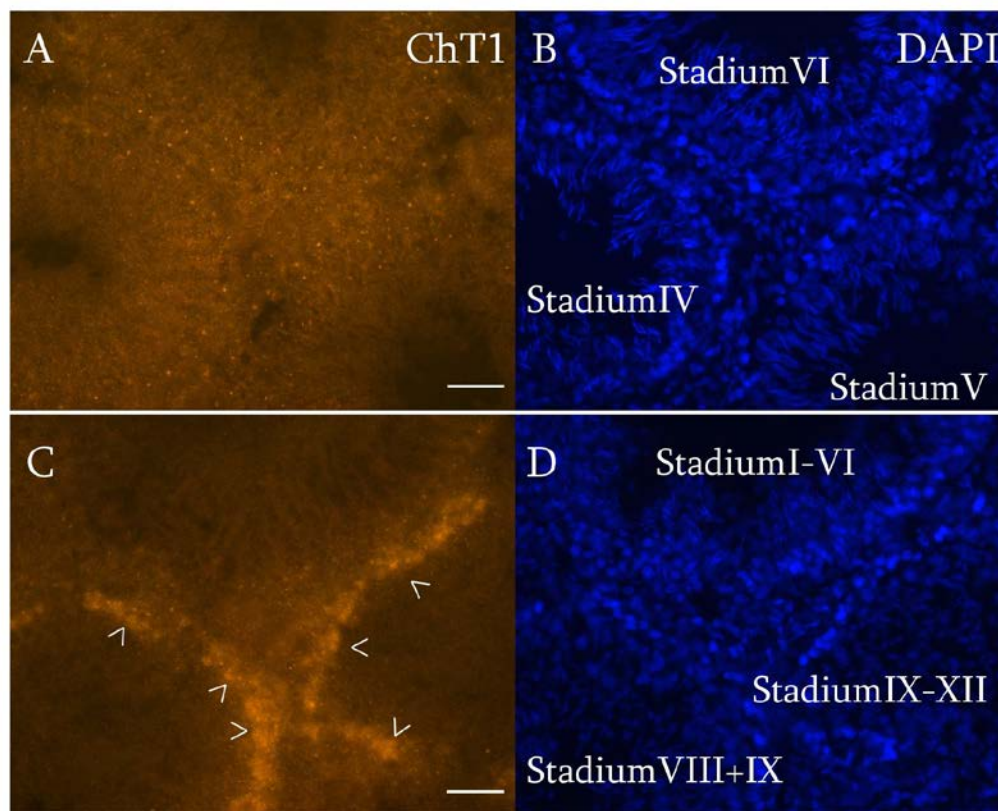


Abb. 3-14: Immunfluoreszenzmikroskopischer Nachweis von ChT1 im unbehandelten Hoden der Ratte (A+C). Anfärbung der Zellkerne mit DAPI (B+D). ChT1 positiv zeigen sich Zellen im Keimepithel wie primäre Spermatozyten (>). Auffallend ist jedoch vor allem die stadienspezifische Expression von ChT1 in Präleptotänspermatozyten (C). In niedrigen Stadien (I-VI) ist ChT1 nicht nachweisbar, höhere Stadien (ab VIII) weisen ChT1-positive Zellen auf. Maßstab: 50 µm.

3.2.3 Vergleich der ChT1 mRNA Expression in EAO- und Adjuvans-Kontrolltieren

Beim Vergleich der ChT1 mRNA Expression mittels RT-PCR-Analyse in Hoden von EAO- und Adjuvans-Kontrolltieren 50 und 80 Tage nach Behandlung fiel auf, dass es sowohl innerhalb der Adjuvans-Kontrolltiere als auch in der Gruppe der Tiere mit experimenteller Autoimmunorchitis im Verlauf der Behandlung zu einer quantitativen Abnahme der Expression kam. Vergleicht man die beiden Gruppen untereinander, so zeigt sich schon bei den Tieren 50 Tage nach Adjuvansbehandlung eine deutlich stärkere Expression als bei den Tieren 50 Tage nach experimenteller Autoimmunorchitis. Allerdings hatte die Adjuvansbehandlung nicht so einen starken Einfluss auf die Abnahme der Expression wie das Auslösen einer Autoimmunorchitis.

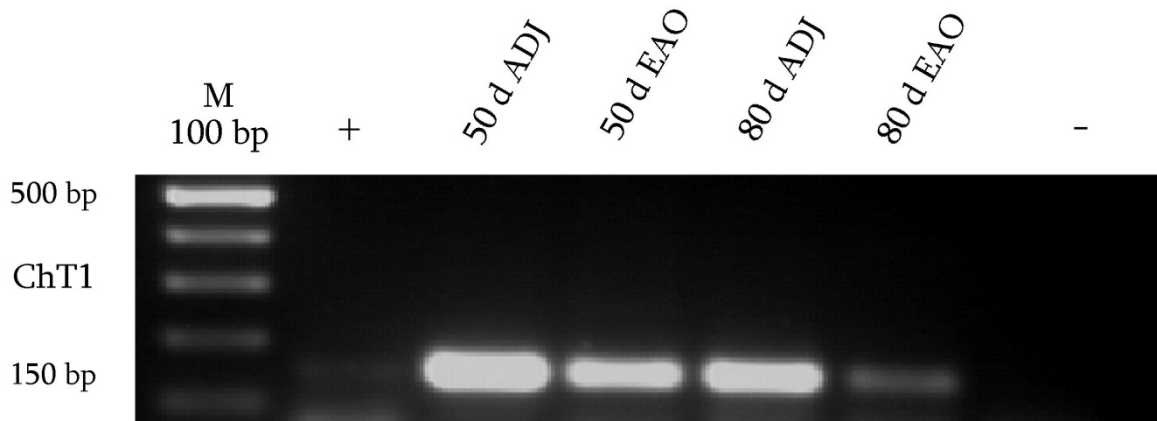


Abb. 3-15: Qualitativer Nachweis der ChT1 mRNA Expression mittels RT-PCR-Analyse im Hoden von EAO- und Adjuvans-Kontrolltieren (ADJ) 50 und 80 Tage (d) nach Behandlung. M: Marker. bp: Basenpaare. Positivkontrolle (+): Großhirn. Negativkontrolle (-): Ansatz ohne cDNA.

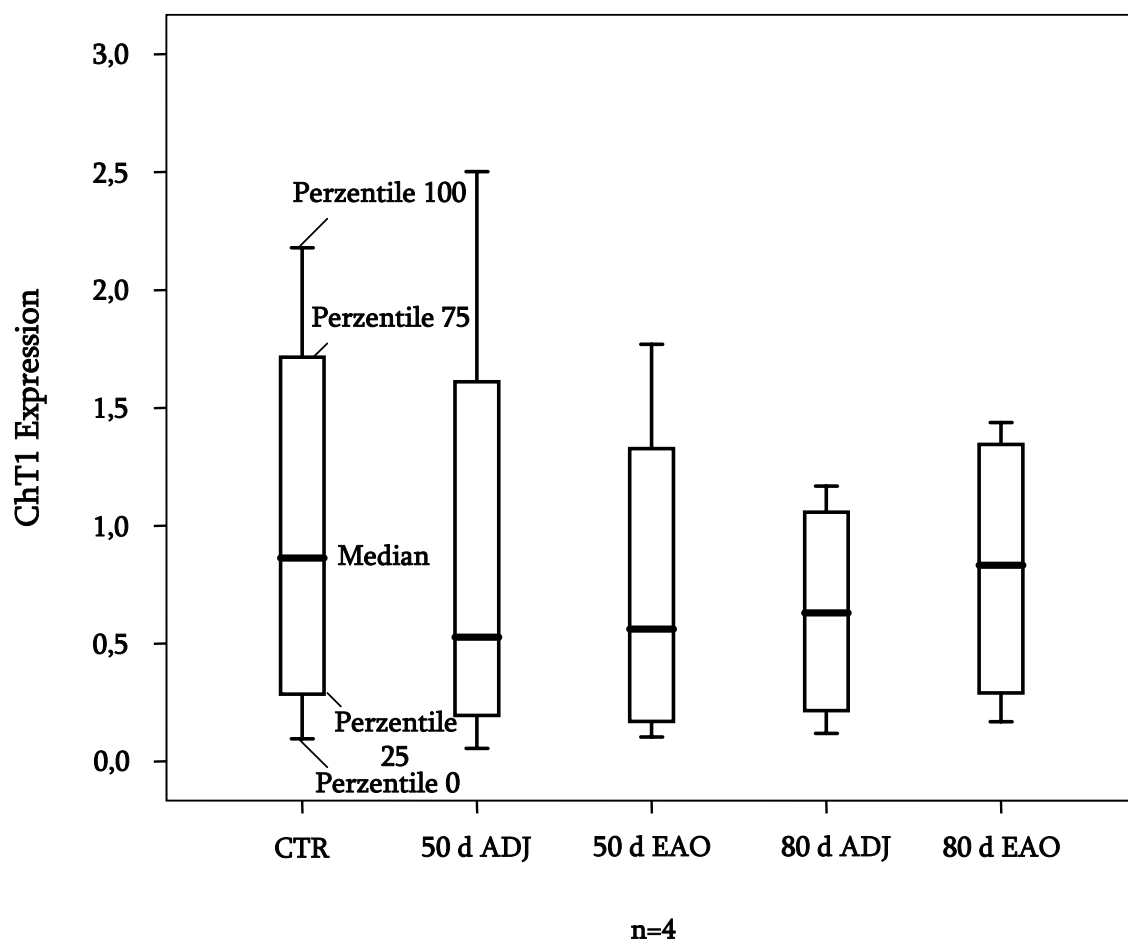


Abb. 3-16: Nachweis der ChT1 mRNA Expression mittels qRT-PCR-Analyse im Hoden von unbehandelten (CTR), EAO- und Adjuvans-Kontrolltieren (ADJ) 50 und 80 Tage (d) nach Behandlung. n = Anzahl der Tiere pro Gruppe. Darstellung im Boxplot mit Perzentile 0 (Minimum), 25, 75, 100 (Maximum) und dem Median (dicke schwarze Linie).

Die Auswertung der qRT-PCR-Analyse mittels des Statistikprogramms SPSS ergab nach dem Kruskal-Wallis-Test keine signifikanten Unterschiede in der Expression der verschiedenen Proben. Prinzipiell hatte jede Art von Behandlung im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (CTR) einen supprimierenden Effekt auf die Expression von ChT1 mRNA, der sich allerdings aufgrund der Streuung relativierte. Der starke Unterschied zwischen Tieren 50 Tage nach Adjuvansbehandlung und 50 Tage nach Autoimmunorchitis, der sich in der qualitativen RT-PCR zeigte, fand sich nicht in der qRT-PCR. Überraschend war auch, dass es 80 Tage nach Orchitis nicht wie beim qualitativen Nachweis zu einer Abnahme, sondern eher zu einer Zunahme der Expression kam.

3.3 VACHT im Hoden der Ratte

3.3.1 Nachweis von VACHT in testikulären Zellen

Im Gegensatz zu ChAT und ChT1 konnte VACHT mRNA mittels RT-PCR-Analyse nur in zwei der sieben isolierten Zellgruppen nachgewiesen werden. Neben Pachytän-Spermatozyten exprimierten nur noch runde Spermatiden den Transporter. Weder frühe Keimzellstadien, Spermatogonien, noch Zytoplasmareste der Spermatiden, Residualkörperchen, zeigten eine VACHT-Markierung. Genauso verhielt es sich auch mit Sertoli-, Peritubulär- und Leydig-Zellen.

Als Positivkontrolle (+) für VACHT diente, wie auch für ChAT und ChT1, Großhirn, in der Negativkontrolle (-) wurde bei sonst gleicher Zusammensetzung des PCR-Ansatzes anstelle von cDNA Aqua ad iniectabilia verwendet. Für die Normalisierung wurde mithilfe des Programms Quantity One, Version 4.5.0, 1D-Analysis Software (BIO-Rad Laboratories, München) die Bandenintensität von VACHT und GAPDH gemessen, in Relation zueinander gesetzt und graphisch dargestellt.

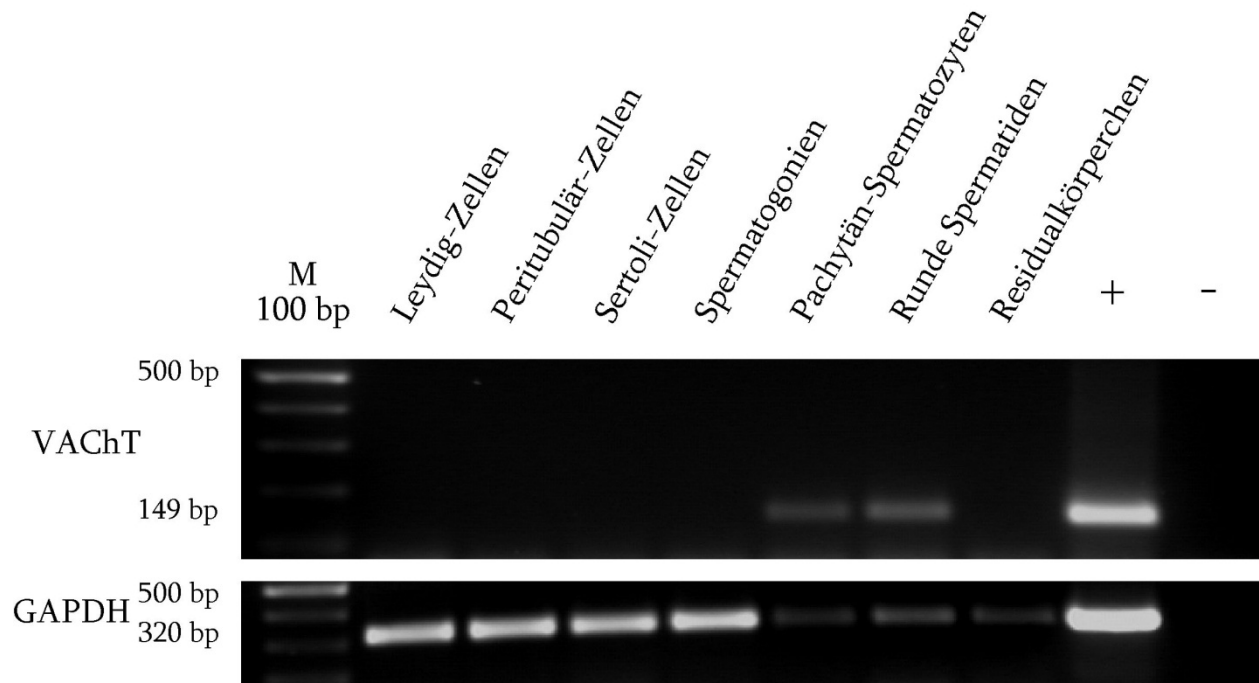


Abb. 3-17: Qualitativer Nachweis der VACHT mRNA Expression mittels RT-PCR-Analyse in verschiedenen isolierten Zellen des Hodens der Ratte. Die GAPDH mRNA Expression wird als Kontrolle für einen gleichmäßigen Probenauftrag verwendet. M: Marker. bp: Basenpaare. Positivkontrolle (+): Großhirn. Negativkontrolle (-): Ansatz ohne cDNA.

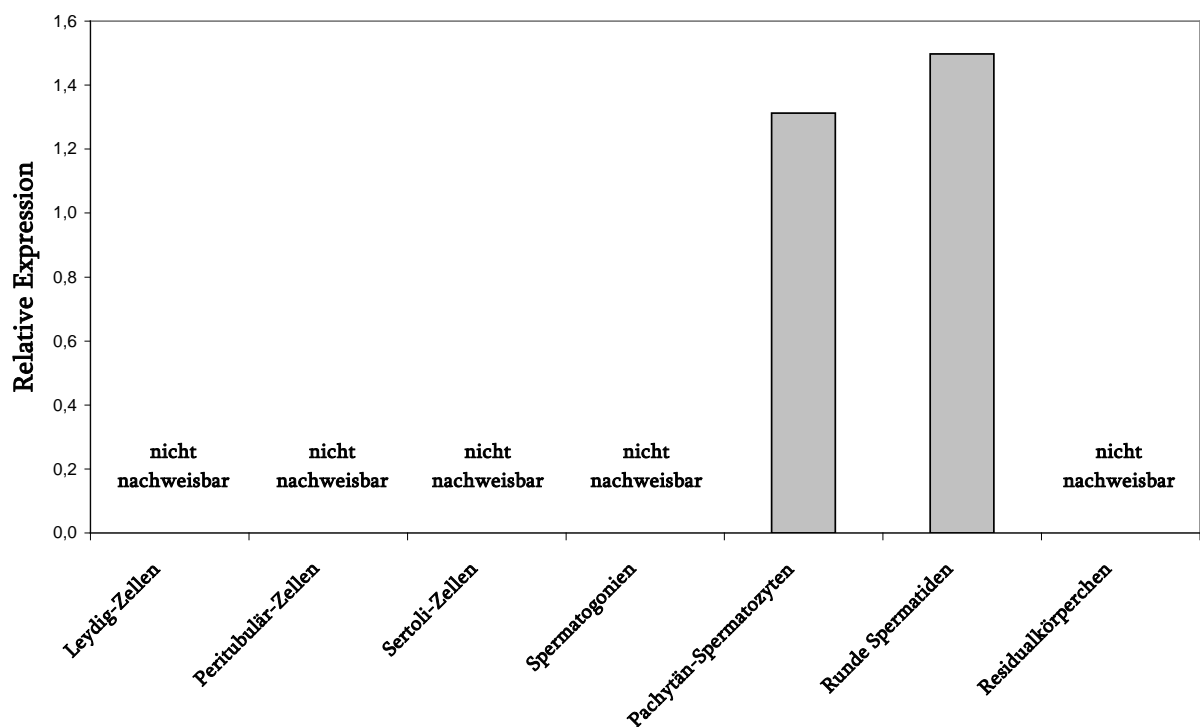


Abb. 3-18: Semiquantitativer Nachweis der VACHT mRNA Expression in verschiedenen isolierten Zellen des Hodens der Ratte nach Normalisierung der RT-PCR-Daten.

3.3.2 Immunfluoreszenzmikroskopischer Nachweis von VACHT

Als Positivkontrolle beim immunfluoreszenzmikroskopischen Nachweis von VACHT an Kryostatschnitten von Rattenhoden wurde Trachea der Ratte eingesetzt. Die sekretorischen Zellen des respiratorischen Epithels zeigten eine positive Reaktion für VACHT. Die Negativkontrolle wurde ohne 1. Antikörper durchgeführt.

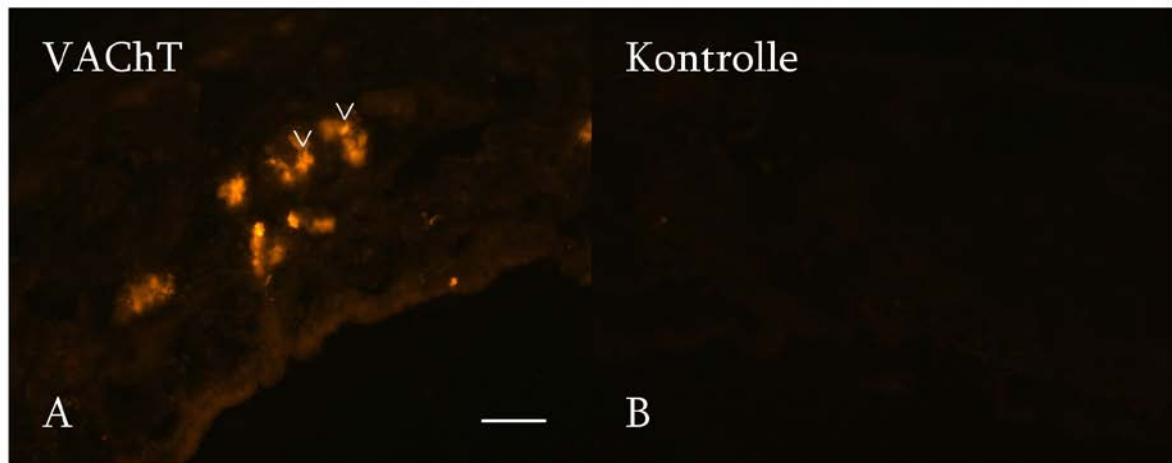


Abb. 3-19: Immunfluoreszenzmikroskopischer Nachweis von VACHT in der Trachea der Ratte als Positivkontrolle (A). Hier reagieren sekretorische Zellen des respiratorischen Epithels (>). Negativkontrolle: Weglassen des Primärantikörpers (B). Maßstab: 50 μm .

Bei der mikroskopischen Auswertung der Immunfluoreszenz war VACHT nur vereinzelt in primären Spermatozyten und runden Spermatiden im Hoden von unbehandelten (CTR) und Adjuvans-Kontrolltieren nachweisbar. In den Schnitten der Orchitistiere fand sich keine VACHT spezifische positive Reaktion.

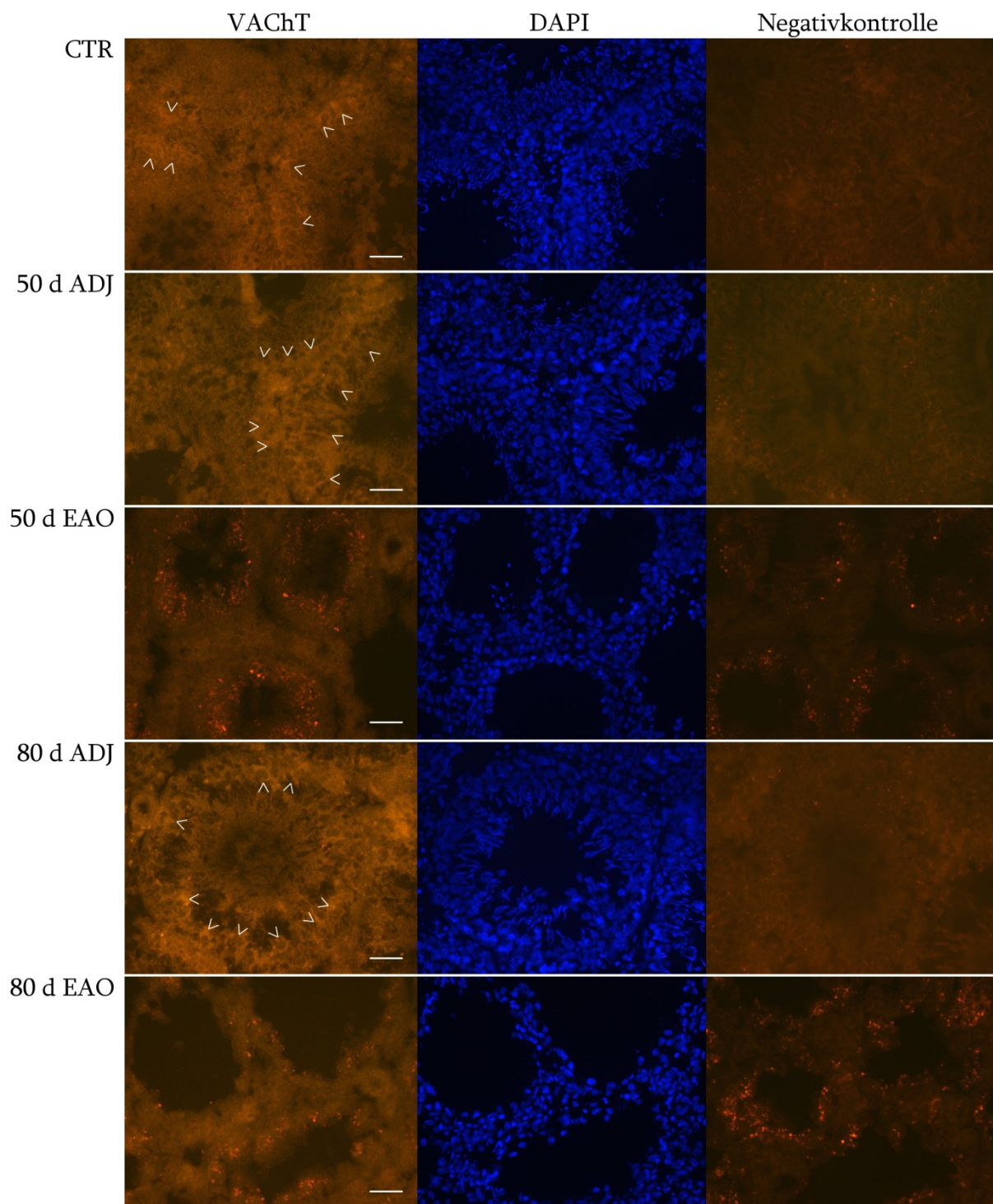


Abb. 3-20: Immunfluoreszenzmikroskopischer Nachweis von VACHT im Hoden von unbehandelten (CTR), EAO- und Adjuvans-Kontrolltieren (ADJ) 50 und 80 Tage (d) nach Behandlung. Anfärbung der Zellkerne mit DAPI und Darstellung der Negativkontrollen (Weglassen des Primärantikörpers). VACHT positive Zellen (>) sind im unbehandelten Hoden, in 50 d und 80 d ADJ primäre Spermatozyten und runde Spermatiden. In 50 d und 80 d EAO finden sich keine VACHT-positiven Zellen. Maßstab: 50 µm.

3.3.3 Vergleich der VACHT mRNA Expression in EAO- und Adjuvans-Kontrolltieren

Bei der RT-PCR-Analyse auf VACHT mRNA in Hoden von EAO- und Adjuvans-Kontrolltieren 50 und 80 Tage nach Behandlung war eine Abnahme der Expression zu beobachten. So fand sich 50 Tage nach Autoimmunorchitis und 80 Tage nach Adjuvansbehandlung eine schwächere und 80 Tage nach Autoimmunorchitis keine Expression von VACHT mRNA mehr.

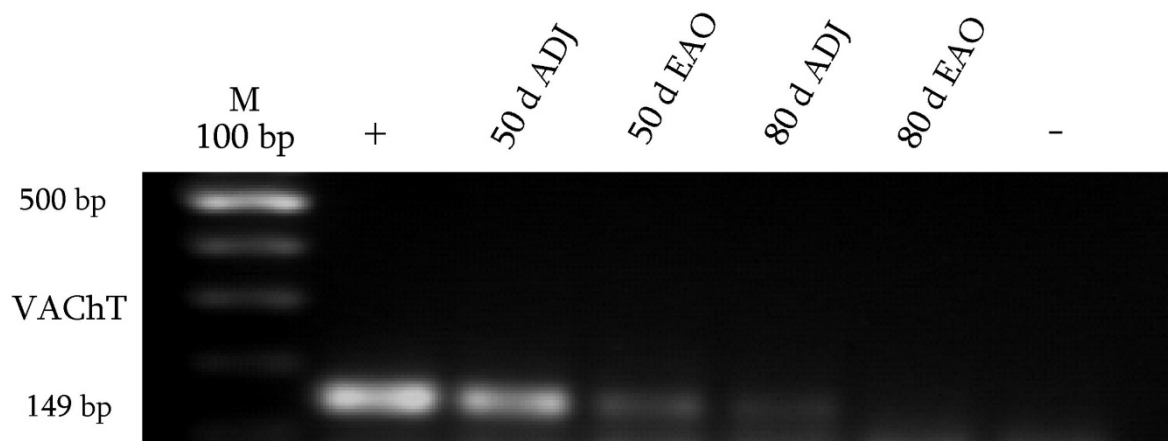


Abb. 3-21: Qualitativer Nachweis der VACHT mRNA Expression mittels RT-PCR-Analyse im Hoden von EAO- und Adjuvans-Kontrolltieren (ADJ) 50 und 80 Tage (d) nach Behandlung. M: Marker. bp: Basenpaare. Positivkontrolle (+): Großhirn. Negativkontrolle (-): Ansatz ohne cDNA.

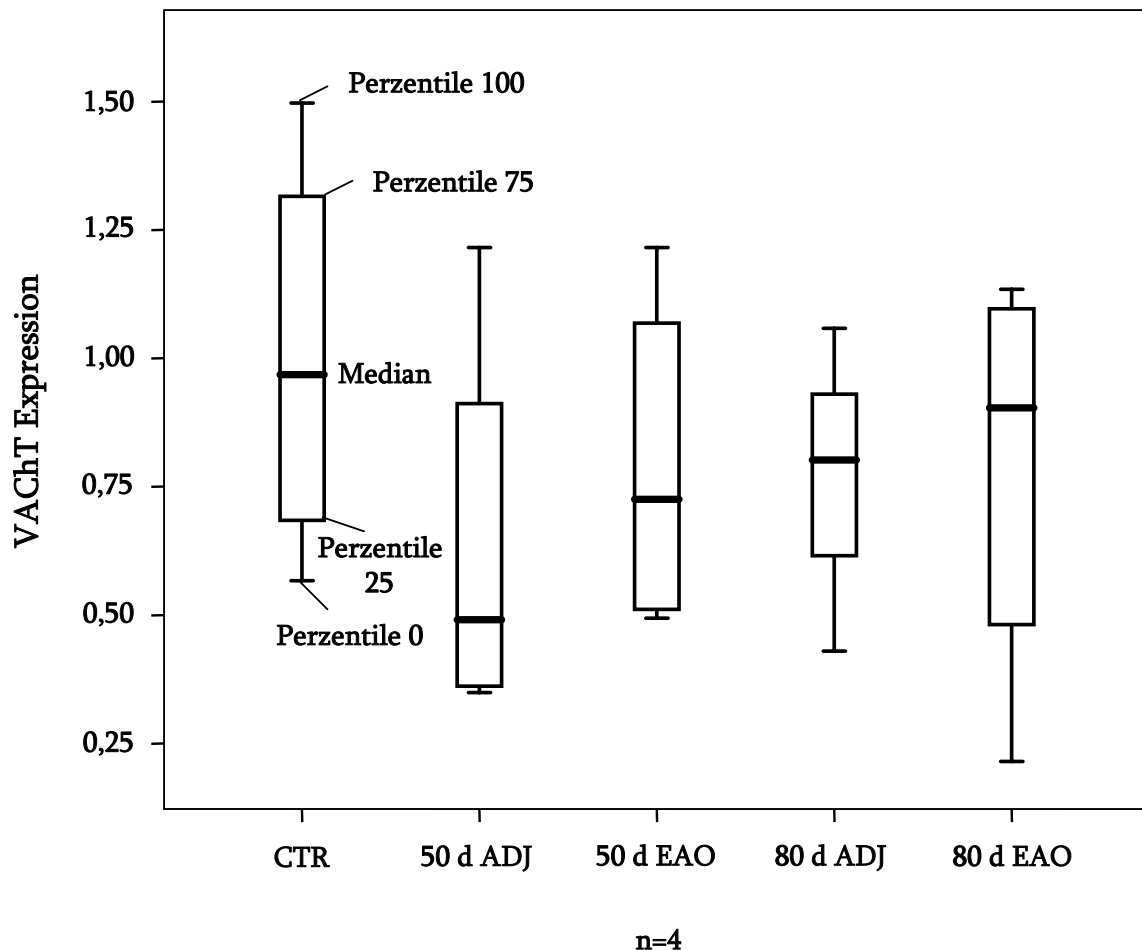


Abb. 3-22: Nachweis der VACHT mRNA Expression mittels qRT-PCR-Analyse im Hoden von unbehandelten (CTR), EAO- und Adjuvans-Kontrolltieren (ADJ) 50 und 80 Tage (d) nach Behandlung. n = Anzahl der Tiere pro Gruppe. Darstellung im Boxplot mit Perzentile 0 (Minimum), 25, 75, 100 (Maximum) und dem Median (dicke schwarze Linie).

Die statistische Auswertung der qRT-PCR-Analyse war aufgrund der hohen interindividuellen Variabilität innerhalb der untersuchten Gruppen schwierig. Doch schien auch die Expression von VACHT mRNA durch jegliche Behandlung eingeschränkt zu werden. Dabei war im Gegensatz zum qualitativen Ergebnis eine Abnahme der Expression am stärksten in den Adjuvans-Kontrolltieren 50 Tage nach Behandlung zu verzeichnen.

3.4 OCT2 im Hoden der Ratte

3.4.1 Nachweis von OCT2 in testikulären Zellen

Der Nachweis von OCT2 mRNA in verschiedenen isolierten Zellen des Hodens mittels RT-PCR-Analyse gelang für die späten Keimzellstadien wie Pachytän-Spermatozyten und runde

Spermatiden, aber auch für Residualkörperchen und Leydig-Zellen. Bei der Gegenüberstellung von Pachytän-Spermatozyten, runden Spermatiden und Residualkörperchen konnte eine stetig abnehmende Expression verzeichnet werden. Im Vergleich zu diesen wiesen Leydig-Zellen einen geringeren Gehalt an OCT2 mRNA auf. In allen anderen untersuchten Zelltypen fand sich kein OCT2. Als Positivkontrolle (+) für OCT2 wurde Niere, in der Negativkontrolle (-) bei sonst gleicher Zusammensetzung des PCR-Ansatzes anstelle von cDNA Aqua ad iniectionem verwendet. Für die Normalisierung wurde mithilfe des Programms Quantity One, Version 4.5.0, 1D-Analysis Software (BIO-Rad Laboratories, München) die Bandenintensität von OCT2 und GAPDH gemessen, in Relation zueinander gesetzt und graphisch dargestellt.

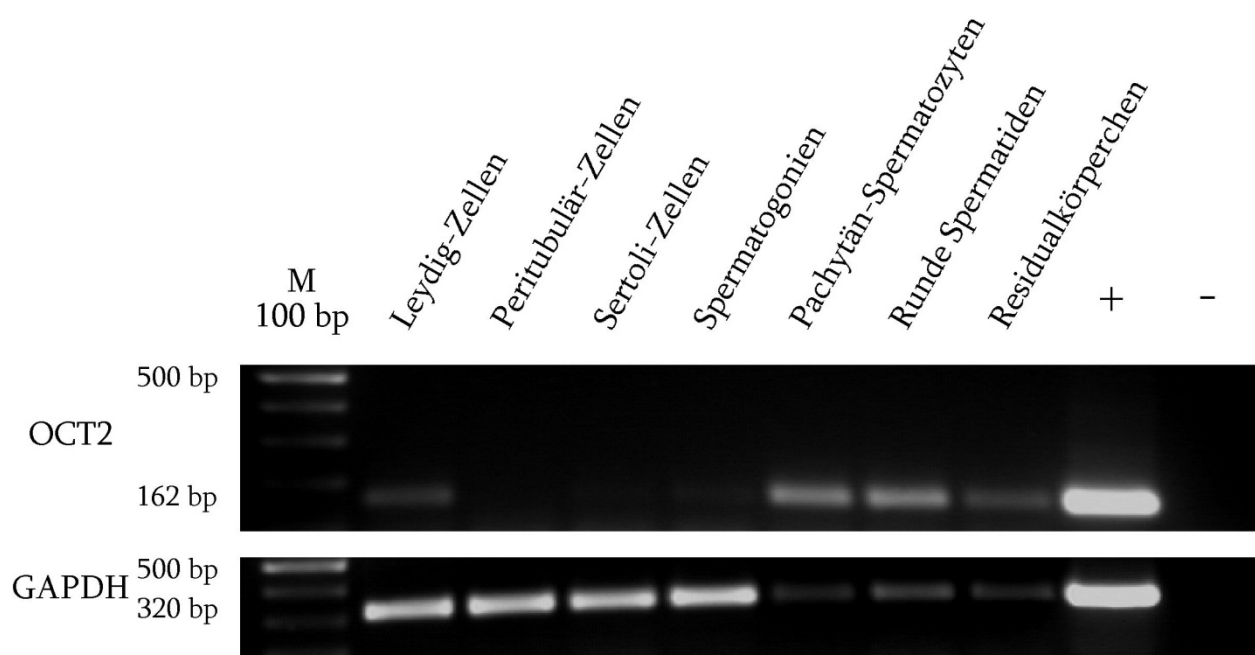


Abb. 3-23: Qualitativer Nachweis der OCT2 mRNA Expression mittels RT-PCR-Analyse in verschiedenen isolierten Zellen des Hodens der Ratte. Die GAPDH mRNA Expression wird als Kontrolle für einen gleichmäßigen Probenauflauf verwendet. M: Marker. bp: Basenpaare. Positivkontrolle (+): Niere. Negativkontrolle (-): Ansatz ohne cDNA.

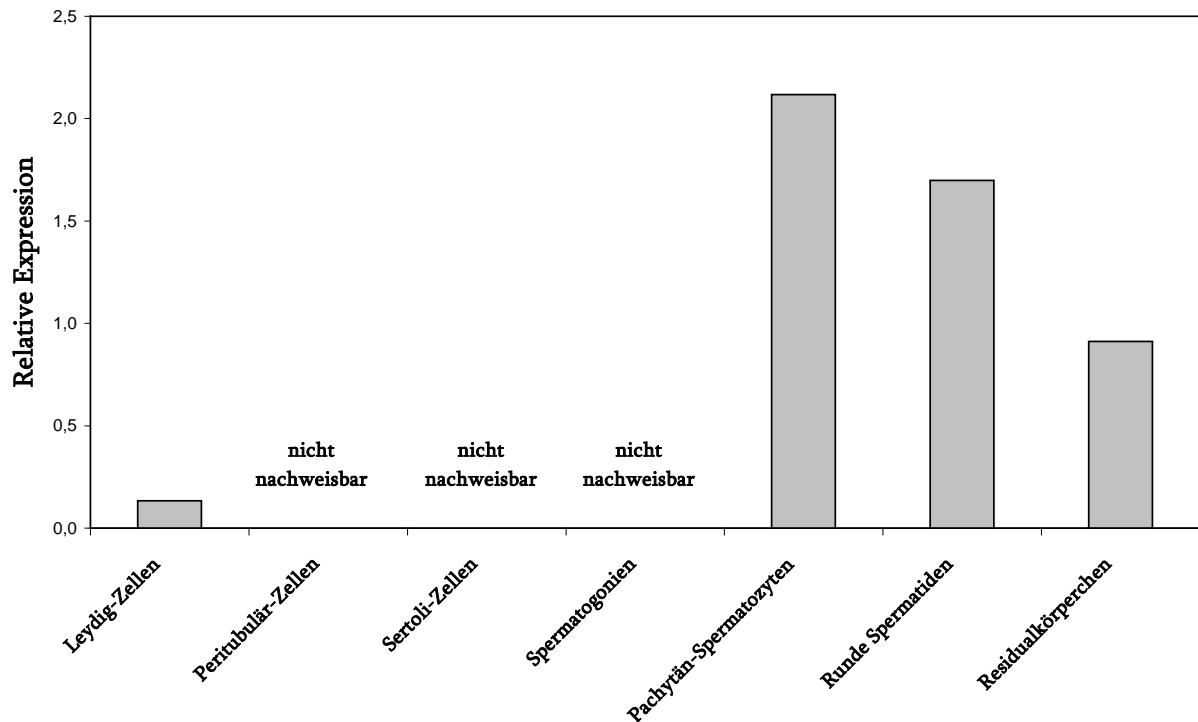


Abb. 3-24: Semiquantitativer Nachweis der OCT2 mRNA Expression in verschiedenen isolierten Zellen des Hodens der Ratte nach Normalisierung der RT-PCR-Daten.

3.4.2 Immunfluoreszenzmikroskopischer Nachweis von OCT2

Für den immunfluoreszenzmikroskopischen Nachweis von OCT2 an Kryostatschnitten von Rattenhoden diente Trachea als Positivkontrolle. Hier konnte OCT2 im apikalen Bereich der kinozilientragenden Zellen nachgewiesen werden. Für die Negativkontrolle wurde bei sonst gleichem Protokoll der Primärantikörper weggelassen, für die Präabsorptionskontrolle dieser mit einem immunogenen Peptid vor dem Auftragen bei Raumtemperatur inkubiert.

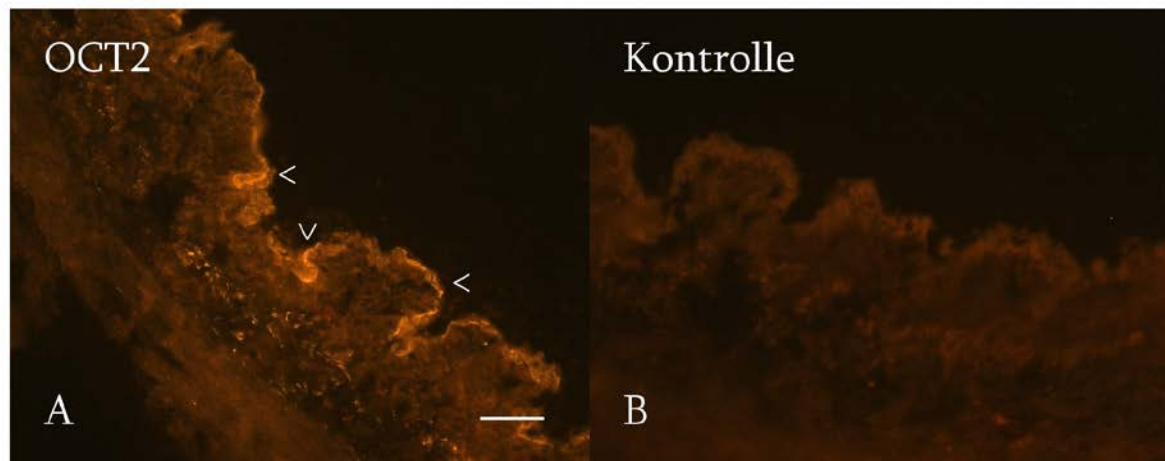


Abb. 3-25: Immunfluoreszenzmikroskopischer Nachweis von OCT2 in der Trachea der Ratte als Positivkontrolle (A). Markiert ist der apikale Bereich der kinozilientragenden Zellen des respiratorischen Epithels (>). Negativkontrolle: Weglassen des Primärantikörpers (B). Maßstab: 50 µm.

Die Ergebnisse der vorausgegangenen RT-PCR-Analyse in isolierten Zellen des Hodens konnten im Rahmen der Immunfluoreszenz nur bedingt reproduziert werden. Die starke Expression in Pachytän-Spermatozyten, runden Spermatiden und Residualkörperchen zeigte sich nicht in der Immunfluoreszenz. Lediglich in den Schnitten der Adjuvans-Kontrolltiere 50 Tage nach Behandlung war OCT2 in Spermatiden und Spermatozoen nachweisbar. Trotz der niedrigen mRNA Expression in Leydig-Zellen konnte eine starke Immunreaktion beobachtet werden. Dieser Effekt zeigte sich nicht nur im Hoden von unbehandelten und Adjuvans-Kontrolltieren, sondern auch in Orchitistieren. Allerdings waren, vor allem 80 Tage nach Auslösen einer Autoimmunorchitis, die Leydig-Zellen schwächer markiert. Die eingeschränkte Qualität der DAPI-Darstellungen ist durch die Fixierung der Schnitte mit Aceton bedingt, welche für die Antikörper OCT2 und 3 notwendig war.

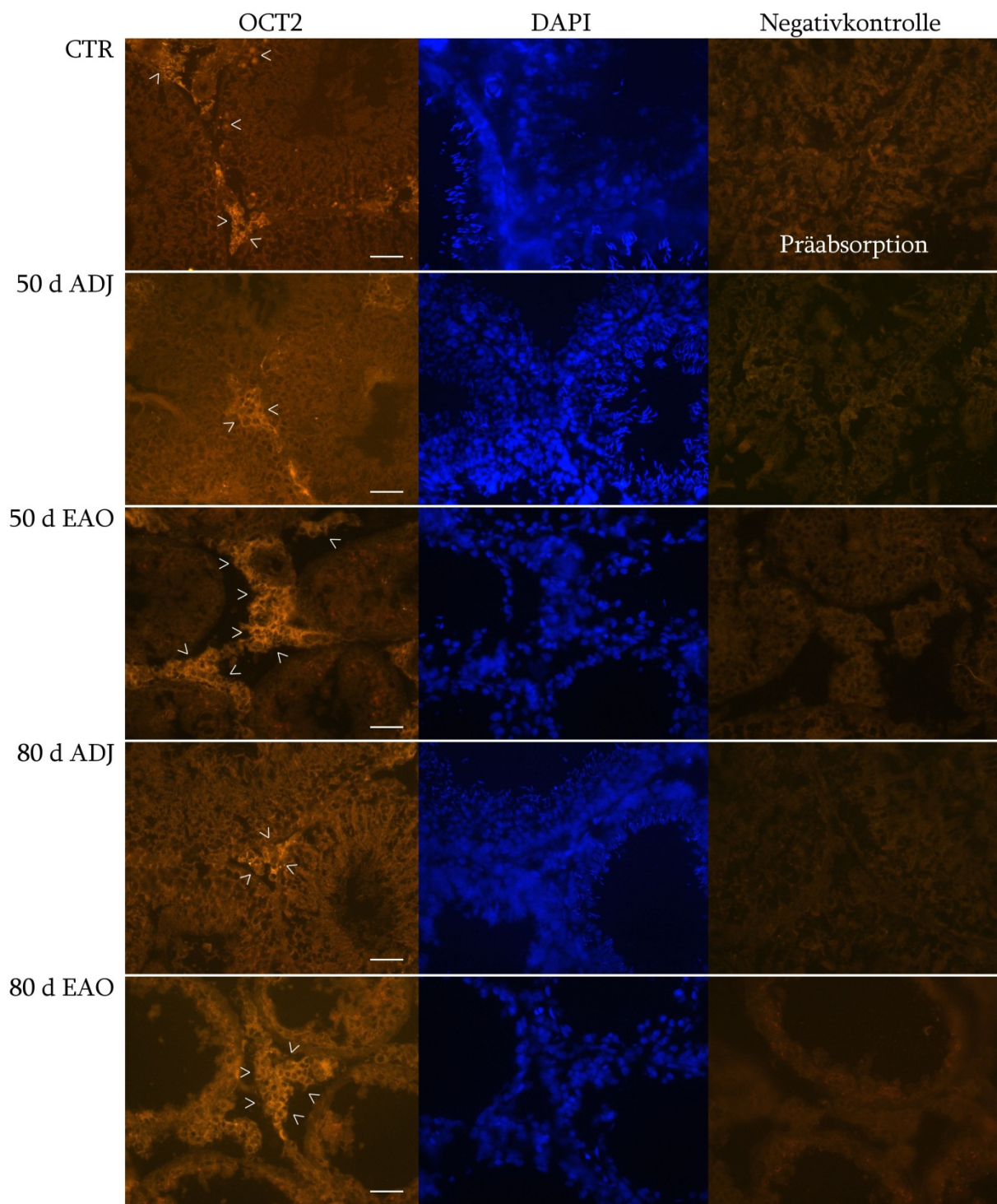


Abb. 3-26: Immunfluoreszenzmikroskopischer Nachweis von OCT2 im Hoden von unbehandelten (CTR), EAO- und Adjuvans-Kontrolltieren (ADJ) 50 und 80 Tage (d) nach Behandlung. Anfärbung der Zellkerne mit DAPI und Darstellung der Präabsorptionskontrolle (mit immunogenem Peptid präinkubierter Primärantikörper) bzw. Negativkontrollen (Weglassen des Primärantikörpers). Im unbehandelten Hoden sind die im Interstitium liegenden Leydig-Zellen OCT2-positiv (>). Als OCT2-positive Zellen können in 50 d ADJ Leydig-Zellen, Spermatozoen und Spermatozoen nachgewiesen werden. Sowohl in 50 d EAO als auch in 80 d ADJ und in 80 d EAO sind ebenfalls Leydig-Zellen markiert, jedoch in unterschiedlicher Intensität. Maßstab: 50 μ m.

3.4.3 Vergleich der OCT2 mRNA Expression in EAO- und Adjuvans-Kontrolltieren

Die RT-PCR-Analyse für OCT2 mRNA in Hoden von EAO- und Adjuvans-Kontrolltieren 50 und 80 Tage nach Behandlung erbrachte den Nachweis, dass die Expression abnahm. Innerhalb der Gruppe der Adjuvans-Kontrolltiere zeigte sich eine starke Reduktion beim Vergleich der Tiere 50 und 80 Tage nach Behandlung. Bei Betrachtung der EAO-Tiere fiel auf, dass die Expression 50 und 80 Tage nach Auslösen der Autoimmunorchitis gleich stark ausgeprägt war, sich aber ein sehr großer Unterschied im Bezug auf die Adjuvans-Kontrolltiere abzeichnete.

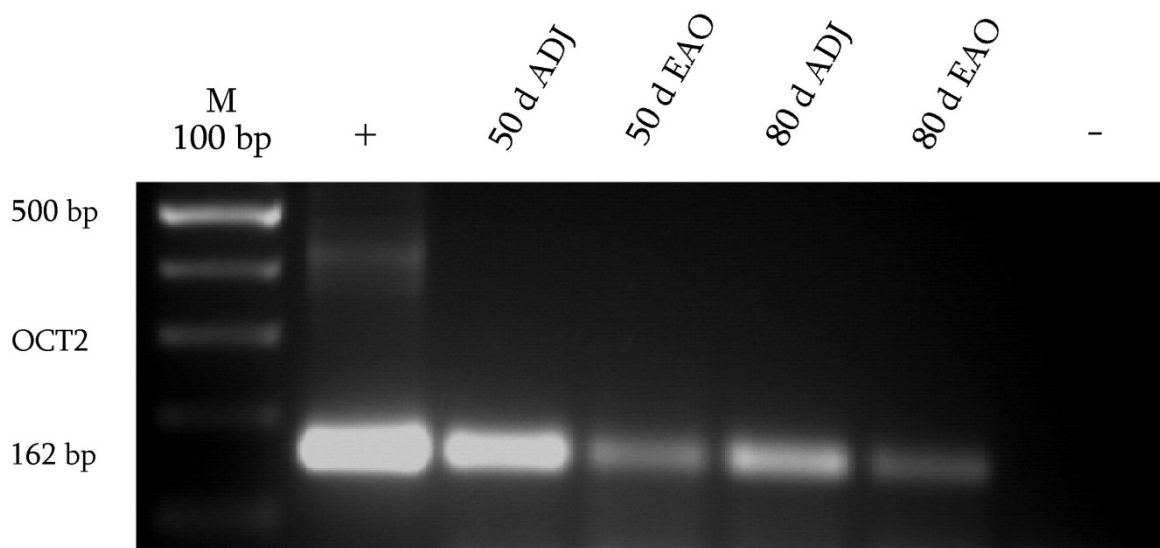


Abb. 3-27: Qualitativer Nachweis der OCT2 mRNA Expression mittels RT-PCR-Analyse im Hoden von EAO- und Adjuvans-Kontrolltieren (ADJ) 50 und 80 Tage (d) nach Behandlung. M: Marker. bp: Basenpaare. Positivkontrolle (+): Niere. Negativkontrolle (-): Ansatz ohne cDNA.

Auch wenn sich bei der statistischen Auswertung der qRT-PCR-Analyse im Kruskal-Wallis-Test keine Signifikanzen zeigten, so waren dennoch deutliche Unterschiede in der Expression erkennbar. Dabei stimmte das Ergebnis sehr gut mit dem der qualitativen PCR überein. Auch hier kam es in allen untersuchten Gruppen sowohl durch die Adjuvansbehandlung als auch das Auslösen einer Autoimmunorchitis zu einer Abnahme der OCT2 mRNA Expression. Besonders stark war diese in den EAO-Ratten ausgeprägt, jedoch war kein Unterschied zwischen Tieren nach 50 und nach 80 Tagen zu erkennen.

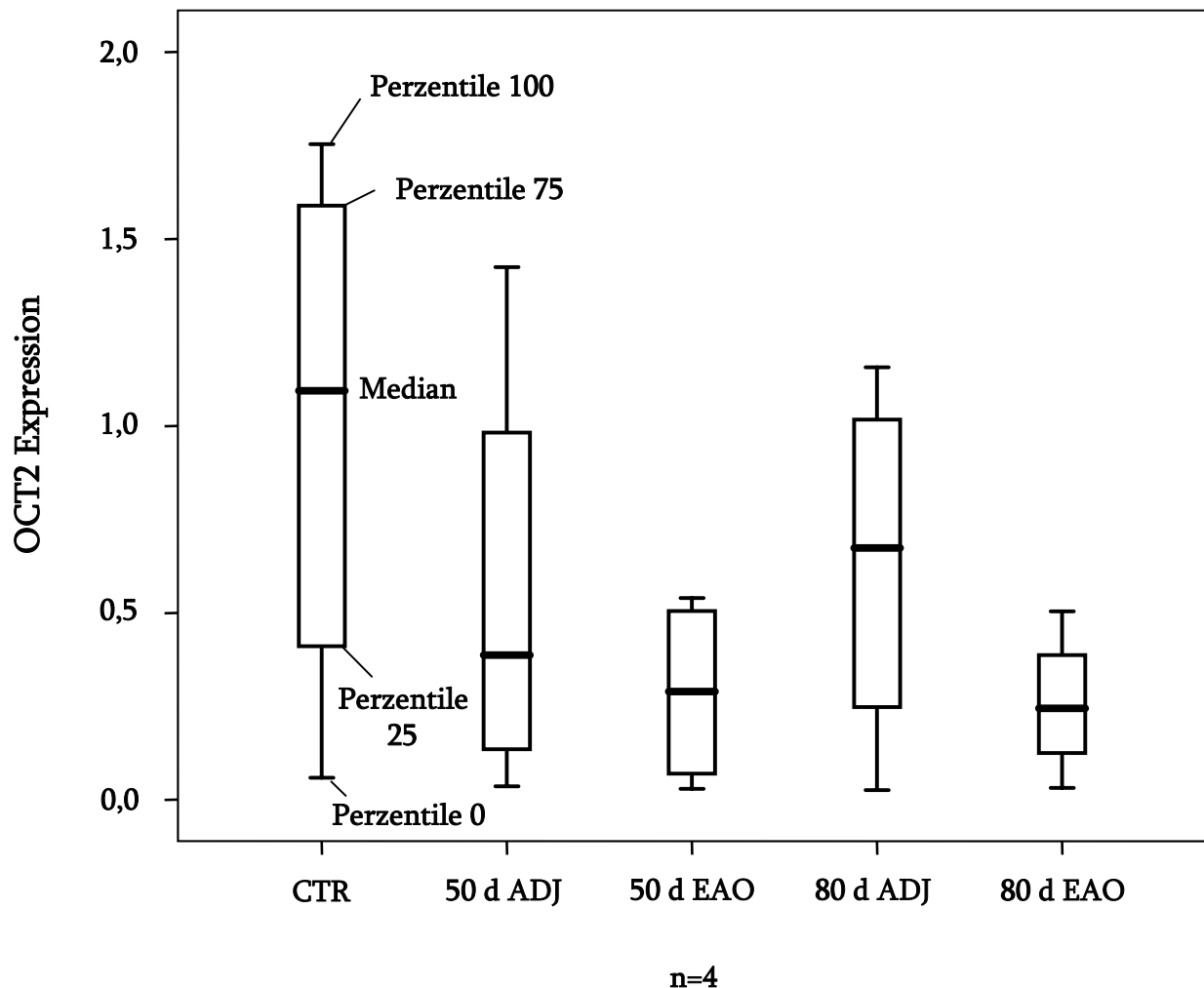


Abb. 3-28: Nachweis der OCT2 mRNA Expression mittels qRT-PCR-Analyse im Hoden von unbehandelten (CTR), EAO- und Adjuvans-Kontrolltieren (ADJ) 50 und 80 Tage (d) nach Behandlung. n = Anzahl der Tiere pro Gruppe. Darstellung im Boxplot mit Perzentile 0 (Minimum), 25, 75, 100 (Maximum) und dem Median (dicke schwarze Linie).

3.5 OCT3 im Hoden der Ratte

3.5.1 Nachweis von OCT3 in testikulären Zellen

OCT3 mRNA ließ sich bei der Untersuchung verschiedener isolierter Zellen des Hodens mittels RT-PCR-Analyse nur in Leydig-Zellen und Spermatogonien nachweisen. Die im Interstitium liegenden Leydig-Zellen zeigten eine stärkere Expression als die frühen Keimzellstadien, Spermatogonien. In den übrigen Zellen konnte keine OCT3 mRNA gefunden werden. Als Positivkontrolle (+) für OCT3 fand Spinalganglion Verwendung, die Negativkontrolle (-) wurde bei sonst gleicher Zusammensetzung ohne cDNA und dafür mit Aqua ad iniectabilia angesetzt.

Für die Normalisierung wurde mithilfe des Programms Quantity One, Version 4.5.0, 1D-Analysis Software (BIO-Rad Laboratories, München) die Bandenintensität von OCT3 und GAPDH gemessen, in Relation zueinander gesetzt und graphisch dargestellt.

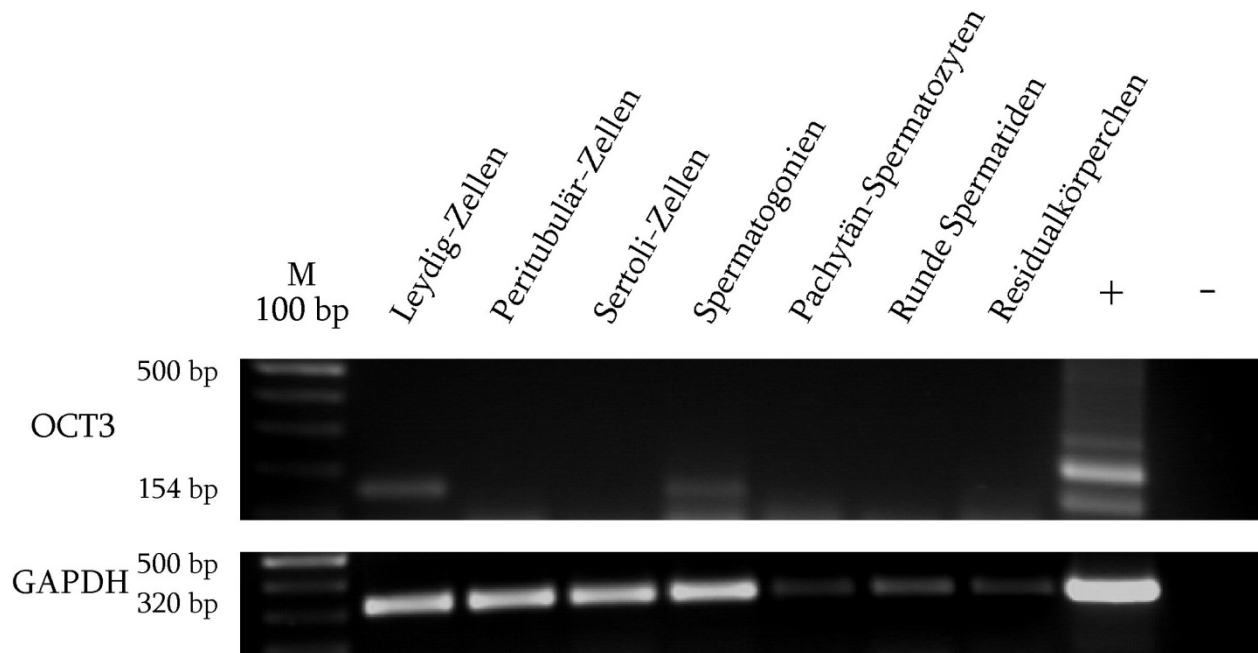


Abb. 3-29: Qualitativer Nachweis der OCT3 mRNA Expression mittels RT-PCR-Analyse in verschiedenen isolierten Zellen des Hodens der Ratte. Die GAPDH mRNA Expression wird als Kontrolle für einen gleichmäßigen Probenauftrag verwendet. M: Marker. bp: Basenpaare. Positivkontrolle (+): Spinalganglion. Negativkontrolle (-): Ansatz ohne cDNA.

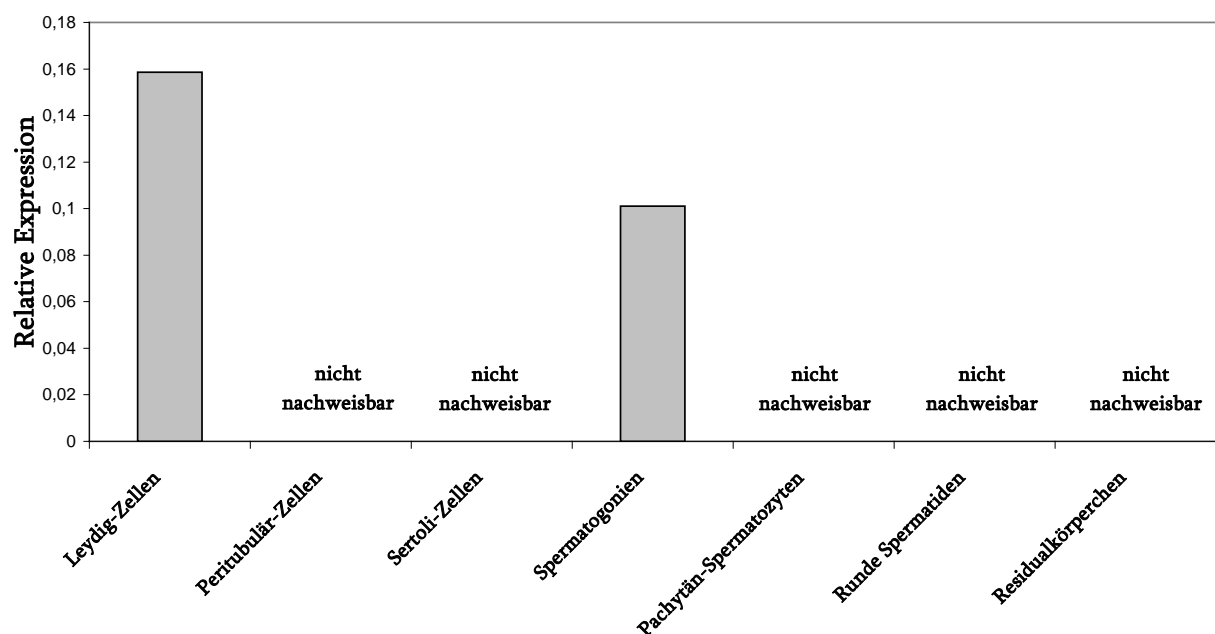


Abb. 3-30: Semiquantitativer Nachweis der OCT3 mRNA Expression in verschiedenen isolierten Zellen des Hodens der Ratte nach Normalisierung der RT-PCR-Daten.

3.5.2 Immunfluoreszenzmikroskopischer Nachweis von OCT3

Als Positivkontrolle für den immunfluoreszenzmikroskopischen Nachweis von OCT3 an Kryostatschnitten von Hoden wurde Trachea gewählt. Wie auch bei OCT2 wurde die OCT3-Immunreaktion im apikalen Bereich der kinozilientragenden Zellen des respiratorischen Epithels dargestellt. Für die Negativkontrolle wurde anstelle des Primärantikörpers PBS+S, für die Präabsorptionskontrolle der zuvor mit immunogenem Peptid inkubierte Primärantikörper verwendet.

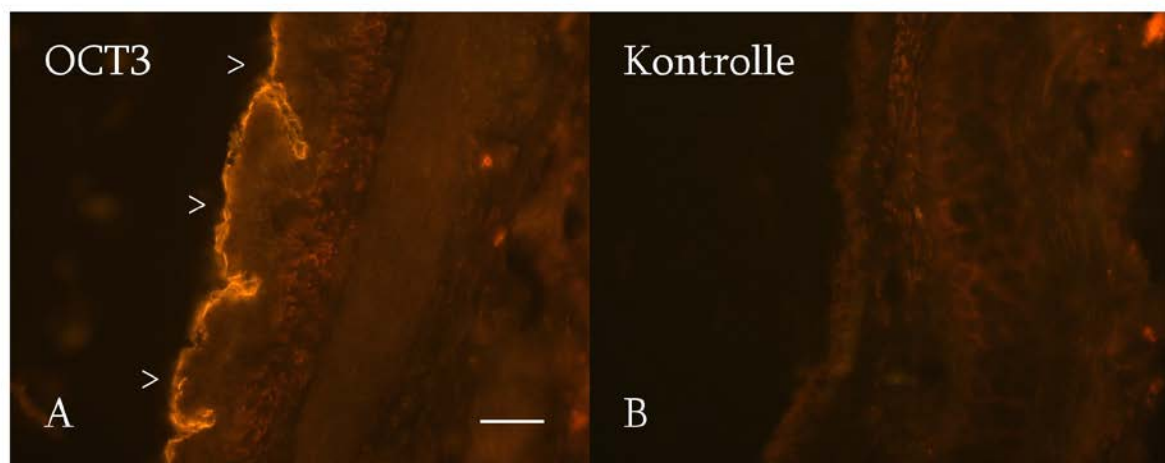


Abb. 3-31: Immunfluoreszenzmikroskopischer Nachweis von OCT3 in der Trachea der Ratte als Positivkontrolle (A). Im apikalen Bereich der kinozilientragenden Zellen des respiratorischen Epithels wurde OCT3 nachgewiesen (>). Negativkontrolle: Weglassen des Primärantikörpers (B). Maßstab: 50 µm.

Die verschiedenen Schnitte, sowohl unbehandelt als auch nach Behandlung, zeigten immunfluoreszenzmikroskopisch eine starke Reaktion in den Leydig-Zellen des intertubulären Raums und bestätigten so das Ergebnis der RT-PCR-Analyse an isolierten Zellen des Hodens. Einzig in Hodenschnitten 80 Tage nach Auslösen einer Autoimmunorchitis waren keine positiven Zellen mehr nachweisbar. Eine Immunreaktion in Spermatogonien, obgleich einer nachgewiesenen OCT3 mRNA Expression in der RT-PCR-Analyse, konnte nicht verzeichnet werden.

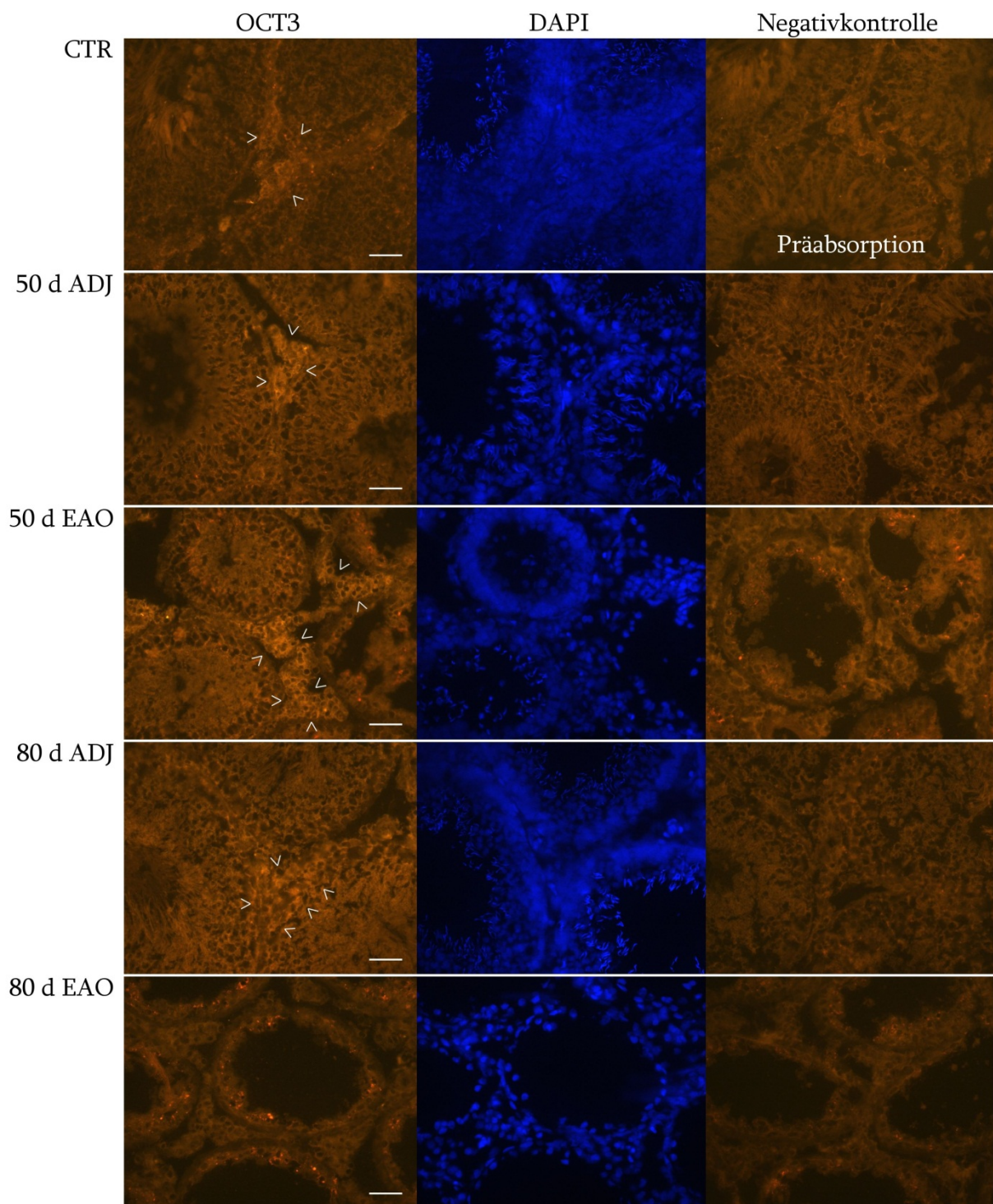


Abb. 3-32: Immunfluoreszenzmikroskopischer Nachweis von OCT3 im Hoden von unbehandelten, EAO- und Adjuvans-Kontrolltieren (ADJ) 50 und 80 Tage (d) nach Behandlung. Anfärbung der Zellkerne mit DAPI und Darstellung der Präabsorptionskontrolle (mit immunogenem Peptid präinkubierter Primärantikörper) bzw. Negativkontrollen (Weglassen des Primärantikörpers). Außer in 80 d EAO konnte sonst in allen Schnitten eine starke Immunreaktion in den im Interstitium liegenden Leydig-Zellen (>) nachgewiesen werden. Maßstab: 50µm.

3.5.3 Vergleich der OCT3 mRNA Expression in EAO- und Adjuvans-Kontrolltieren

Bei der vergleichenden Untersuchung von EAO- und Adjuvans-Kontrolltieren 50 und 80 Tage nach Behandlung mittels RT-PCR-Analyse zeigte sich kein Unterschied in der Expression von OCT3 mRNA zwischen den Adjuvans-Kontrolltieren und den Tieren mit experimentell ausgelöster Autoimmunorchitis. Allerdings spielte die Dauer der Behandlung eine Rolle, so dass nach 80 Tagen sowohl in den Adjuvans- als auch EAO-Tieren eine deutliche Abnahme der Expression zu verzeichnen war. Dies bestätigte die Ergebnisse der Immunfluoreszenz.

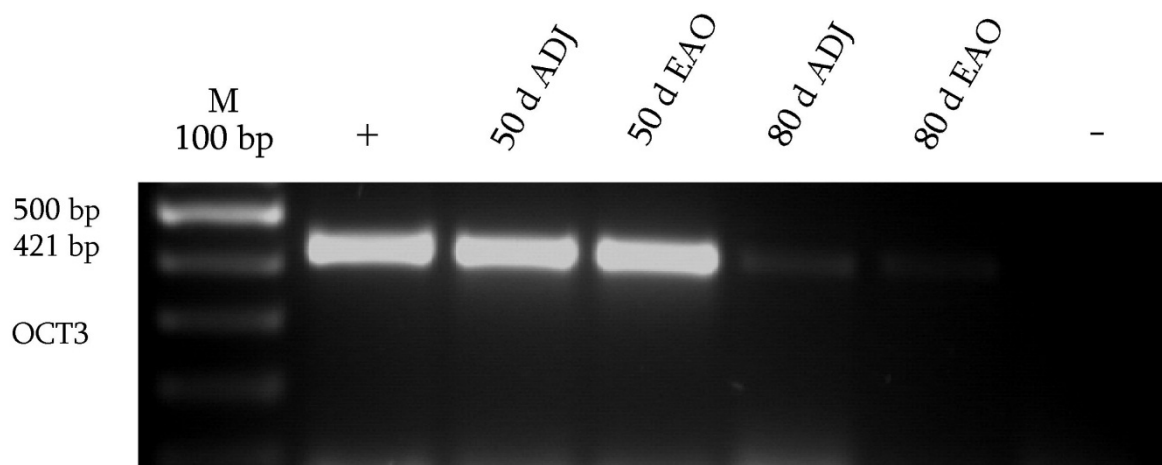


Abb. 3-33: Qualitativer Nachweis der OCT3 mRNA Expression mittels RT-PCR-Analyse in EAO- und Adjuvans-Kontrolltieren (ADJ) 50 und 80 Tage (d) nach Behandlung. M: Marker. bp: Basenpaare. Positivkontrolle (+): Spinalganglion. Negativkontrolle (-): Ansatz ohne cDNA.

Aufgrund der mangelhaften Schmelzkurvenanalyse in der qRT-PCR und ungenügender Verbesserung dieser durch Variation der Annealing Temperatur mittels einer Gradienten-PCR, wurden keine weiteren qRT-PCR-Versuche durchgeführt.

3.6 nAChR α 7-Untereinheit im Hoden der Ratte

3.6.1 Nachweis der nAChR α 7-Untereinheit in testikulären Zellen

Mittels RT-PCR-Analyse in verschiedenen isolierten Zellen des Hodens wurde nachgewiesen, dass die mRNA der nAChR α 7-Untereinheit gleich stark in Peritubulär-, Sertoli-Zellen und Spermatogonien exprimiert wird. Einen höheren Gehalt wiesen Leydig-Zellen und Pachytän-Spermatozyten auf. Erstaunlicherweise war die nAChR α 7-

Untereinheit weder in runden Spermatisiden noch in Residualkörperchen lokalisiert, obwohl der Rezeptor am stärksten in Pachytän-Spermatozyten zu finden war.

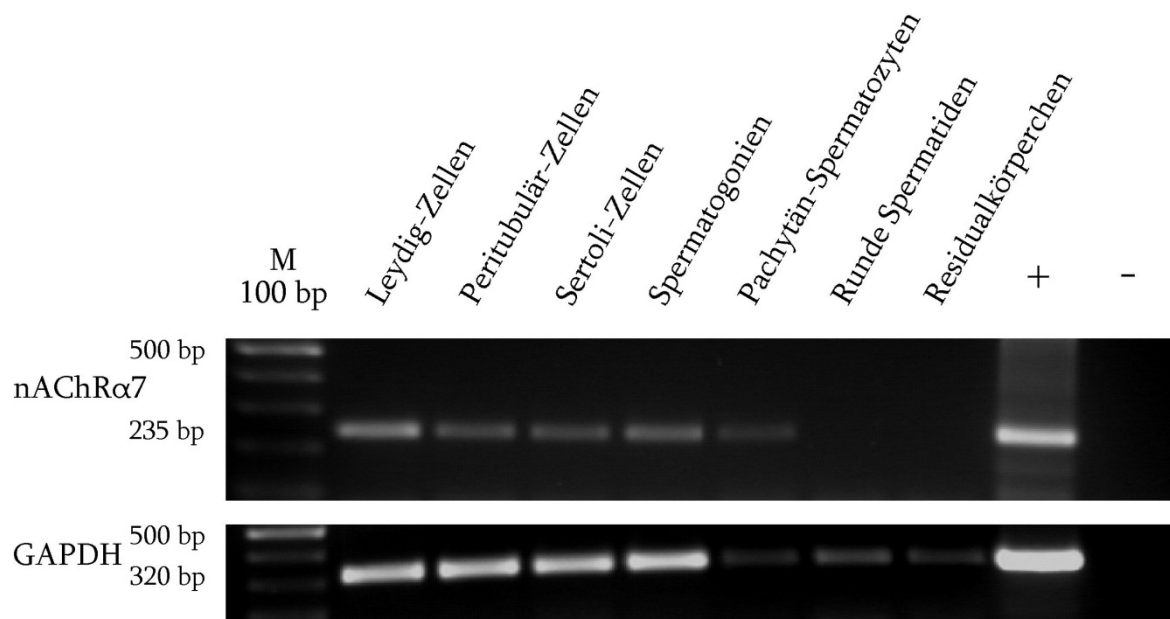


Abb. 3-34: Qualitativer Nachweis der nAChRα7-Untereinheit mRNA Expression mittels RT-PCR-Analyse in verschiedenen isolierten Zellen des Hodens der Ratte. Die GAPDH mRNA Expression wird als Kontrolle für einen gleichmäßigen Probenauftrag verwendet. M: Marker. bp: Basenpaare. Positivkontrolle (+): Spinalganglion. Negativkontrolle (-): Ansatz ohne cDNA.

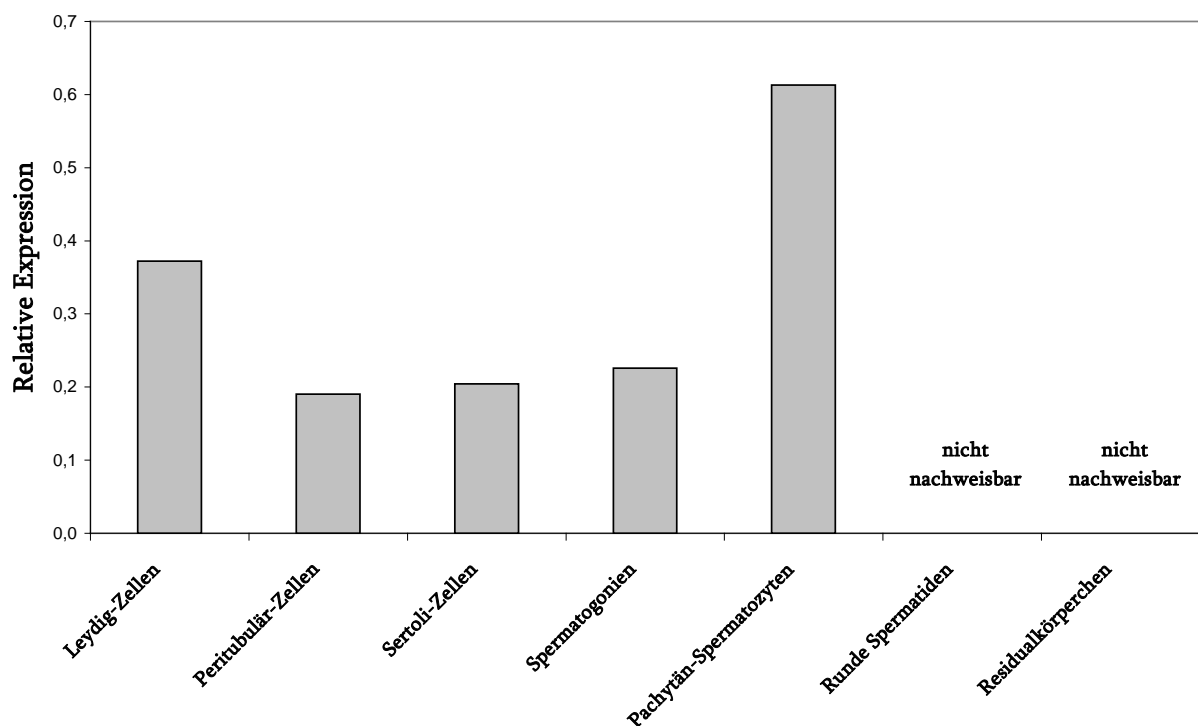


Abb. 3-35: Semiquantitativer Nachweis der nAChRα7-Untereinheit mRNA Expression in verschiedenen isolierten Zellen des Hodens der Ratte nach Normalisierung der RT-PCR-Daten.

Da für die Rezeptoruntereinheiten keine spezifischen Antikörper vorhanden sind (Herber et al., 2004; Moser et al., 2007), war es nicht möglich die Verbreitung der Rezeptoruntereinheiten nAChR α 7 und nAChR α 4 noch detaillierter zu analysieren.

3.6.2 Vergleich der nAChR α 7-Untereinheit mRNA Expression in EAO- und Adjuvans-Kontrolltieren

Beim Vergleich von EAO- und Adjuvans-Kontrolltieren 50 und 80 Tage nach Behandlung zeigten sich im Rahmen der qualitativen PCR für die nAChR α 7-Untereinheit nur geringe Unterschiede. So wurde die Rezeptoruntereinheit in Tieren mit Autoimmunorchitis 50 Tage nach Behandlung etwas schwächer als in den Adjuvantstieren exprimiert. Eine weitere Abnahme war nach 80 Tagen zu verzeichnen.

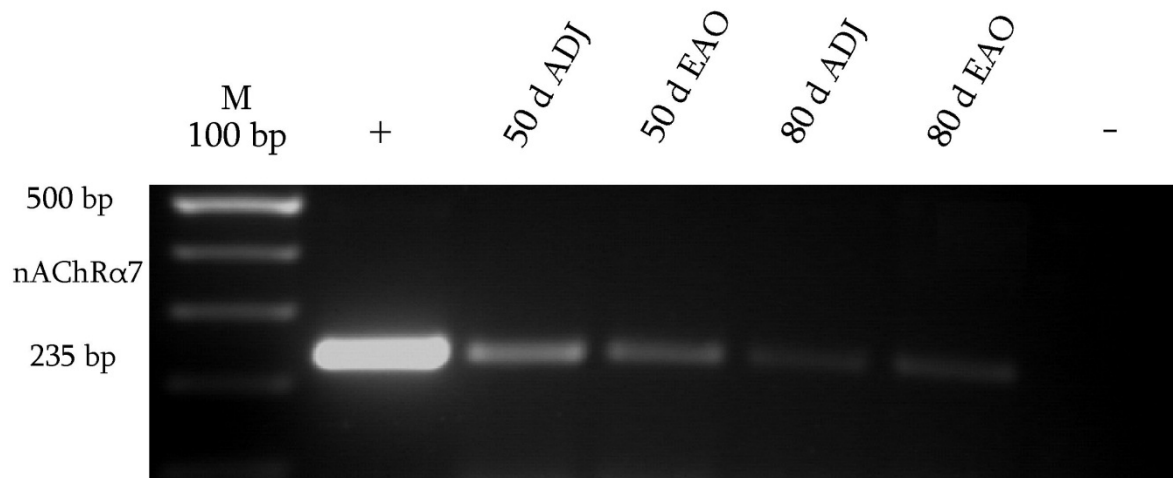


Abb. 3-36: Qualitativer Nachweis der nAChR α 7-Untereinheit mRNA Expression mittels RT-PCR-Analyse in EAO- und Adjuvans-Kontrolltieren (ADJ) 50 und 80 Tage (d) nach Behandlung. M: Marker. bp: Basenpaare. Positivkontrolle (+): Spinalganglion. Negativkontrolle (-): Ansatz ohne cDNA.

Ähnlich verhielt es sich auch beim quantitativen Nachweis der nAChR α 7-Untereinheit mRNA. Allerdings wiesen Tiere 50 Tage nach Auslösen einer Autoimmunorchitis die stärkste Suppression der nAChR α 7-Untereinheit mRNA Expression im Vergleich zu Tieren mit Adjuvansbehandlung oder länger andauernder Orchitis auf.

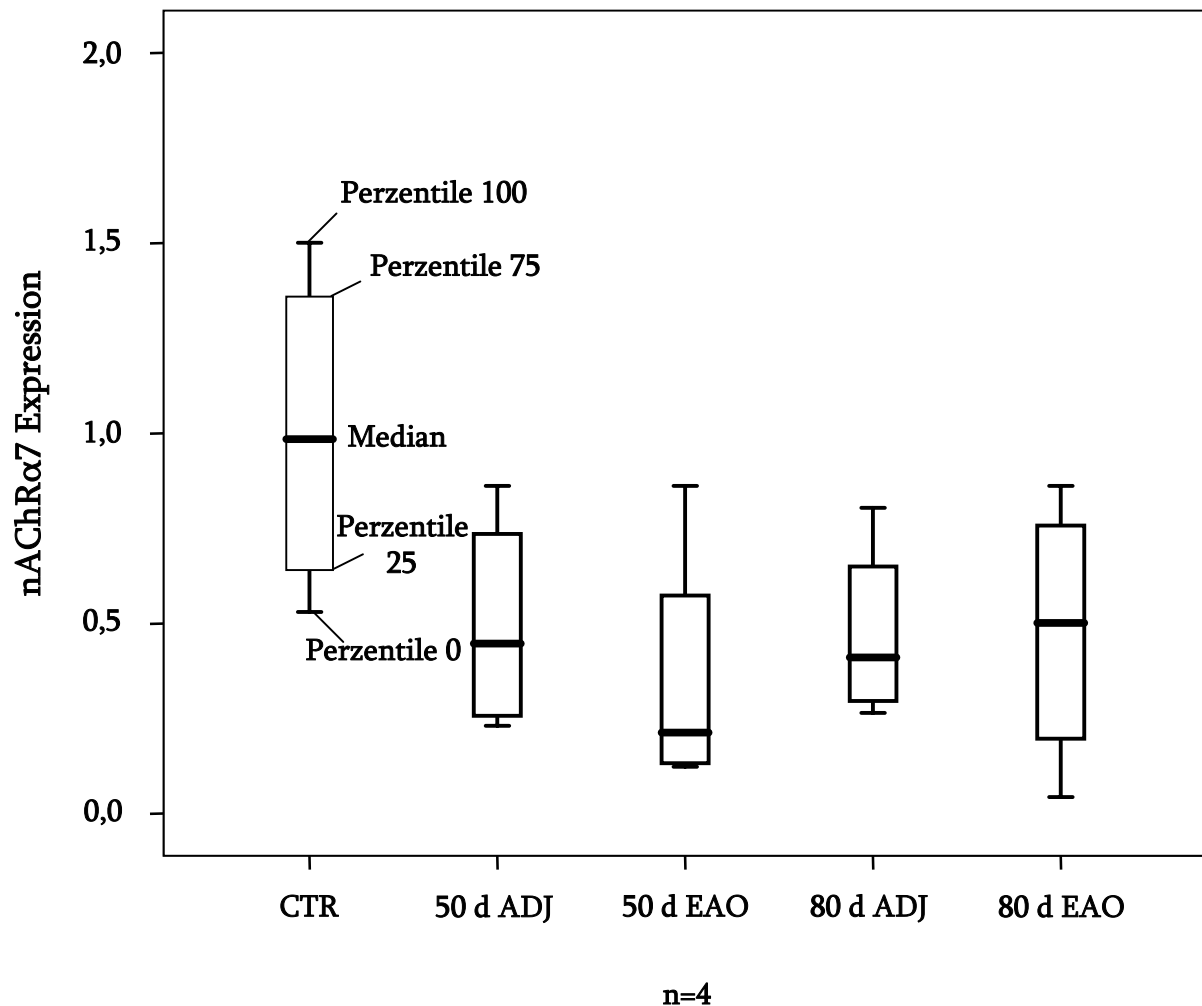


Abb. 3-37: Nachweis der nAChR α 7 mRNA Expression mittels qRT-PCR-Analyse im Hoden von unbehandelten (CTR), EAO- und Adjuvans-Kontrolltieren (ADJ) 50 und 80 Tage (d) nach Behandlung. n = Anzahl der Tiere pro Gruppe. Darstellung im Boxplot mit Perzentile 0 (Minimum), 25, 75, 100 (Maximum) und dem Median (dicke schwarze Linie).

3.7 nAChR α 4-Untereinheit im Hoden der Ratte

3.7.1 Nachweis der nAChR α 4-Untereinheit in testikulären Zellen

Die RT-PCR-Analyse von verschiedenen isolierten Zellen des Hodens erbrachte den Nachweis von nAChR α 4-Untereinheit mRNA in Leydig-, Peritubulär-Zellen, Spermatogonien, Pachytän-Spermatozyten und Residualkörperchen. Keine Expression war in Sertoli-Zellen und, wie auch bei der nAChR α 7-Untereinheit, in runden Spermatisden zu finden. Am stärksten exprimierten Residualkörperchen die Rezeptoruntereinheit, am schwächsten Spermatogonien und Peritubulär-Zellen.

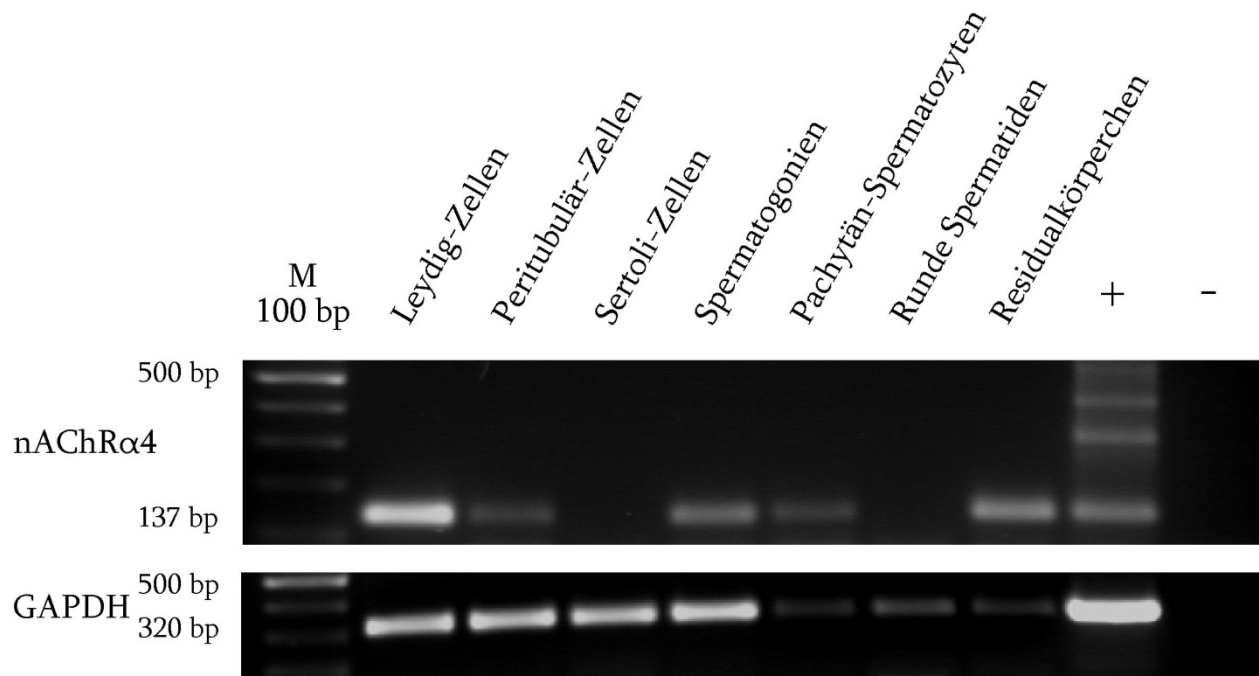


Abb. 3-38: Qualitativer Nachweis der nAChRα4-Untereinheit mRNA Expression mittels RT-PCR-Analyse in verschiedenen isolierten Zellen des Hodens der Ratte. Die GAPDH mRNA Expression wird als Kontrolle für einen gleichmäßigen Probenaufrag verwendet. M: Marker. bp: Basenpaare. Positivkontrolle (+): Rückenmark. Negativkontrolle (-): Ansatz ohne cDNA.

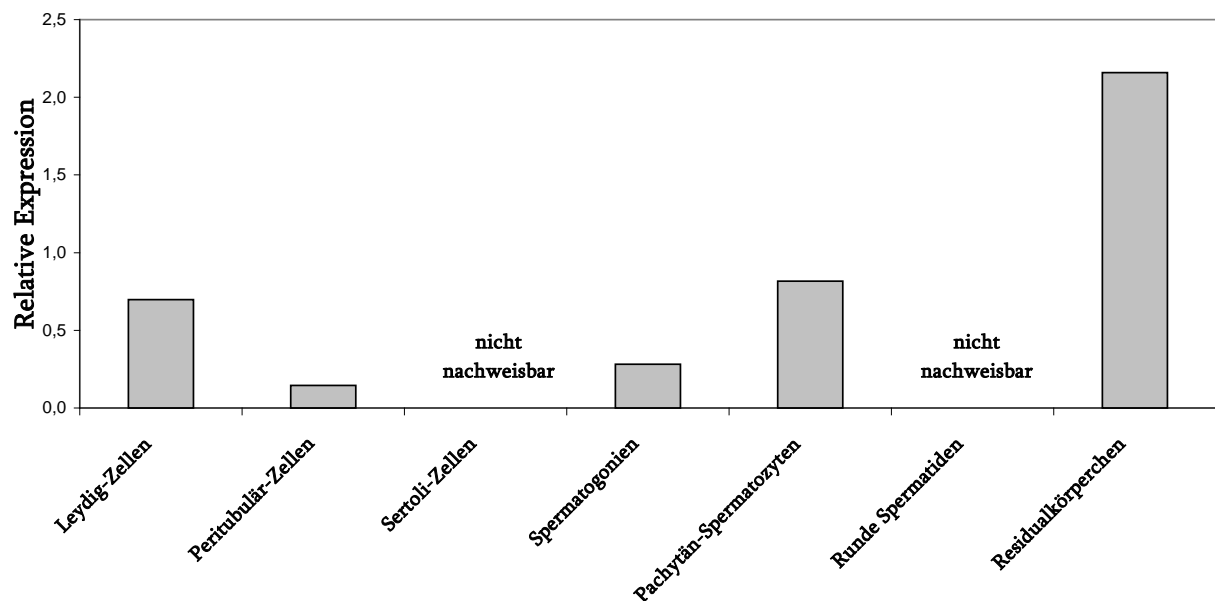


Abb. 3-39: Semiquantitativer Nachweis der nAChRα4-Untereinheit mRNA Expression in verschiedenen isolierten Zellen des Hodens der Ratte nach Normalisierung der RT-PCR-Daten.

3.7.2 Vergleich der nAChR α 4-Untereinheit mRNA Expression in EAO- und Adjuvans-Kontrolltieren

Auf die mRNA Expression der Rezeptoruntereinheit nAChR α 4 scheint nach qualitativer RT-PCR-Analyse weder die Adjuvansbehandlung noch die Autoimmunorchitis einen wesentlichen Einfluss zu haben. Lediglich Adjuvans-Kontrolltiere 80 Tage nach Behandlung wiesen einen stärkeren Gehalt an nAChR α 4 mRNA als die übrigen Gruppen auf.

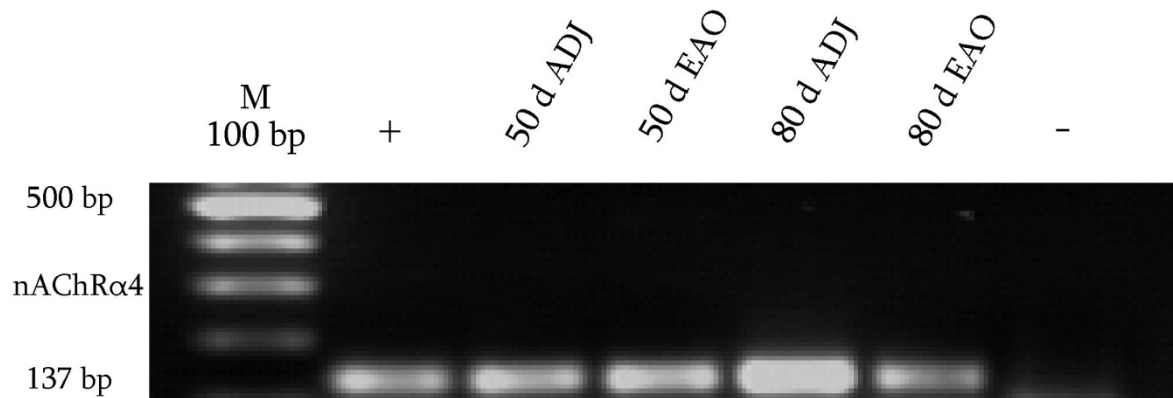


Abb. 3-40: Qualitativer Nachweis der nAChR α 4-Untereinheit mRNA Expression mittels RT-PCR-Analyse in EAO- und Adjuvans-Kontrolltieren (ADJ) 50 und 80 Tage (d) nach Behandlung. M: Marker. bp: Basenpaare. Positivkontrolle (+): Rückenmark. Negativkontrolle (-): Ansatz ohne cDNA.

Auch die statistische Auswertung der qRT-PCR-Analyse zeigte keine signifikanten Unterschiede in der Expression von nAChR α 4 mRNA beim Vergleich von EAO- und Adjuvans-Kontrolltieren (ADJ) 50 und 80 Tage nach Behandlung. Auffallend ist jedoch die starke Schwankung der Werte in der Gruppe der Tiere 80 Tage nach Auslösen einer Autoimmunorchitis.

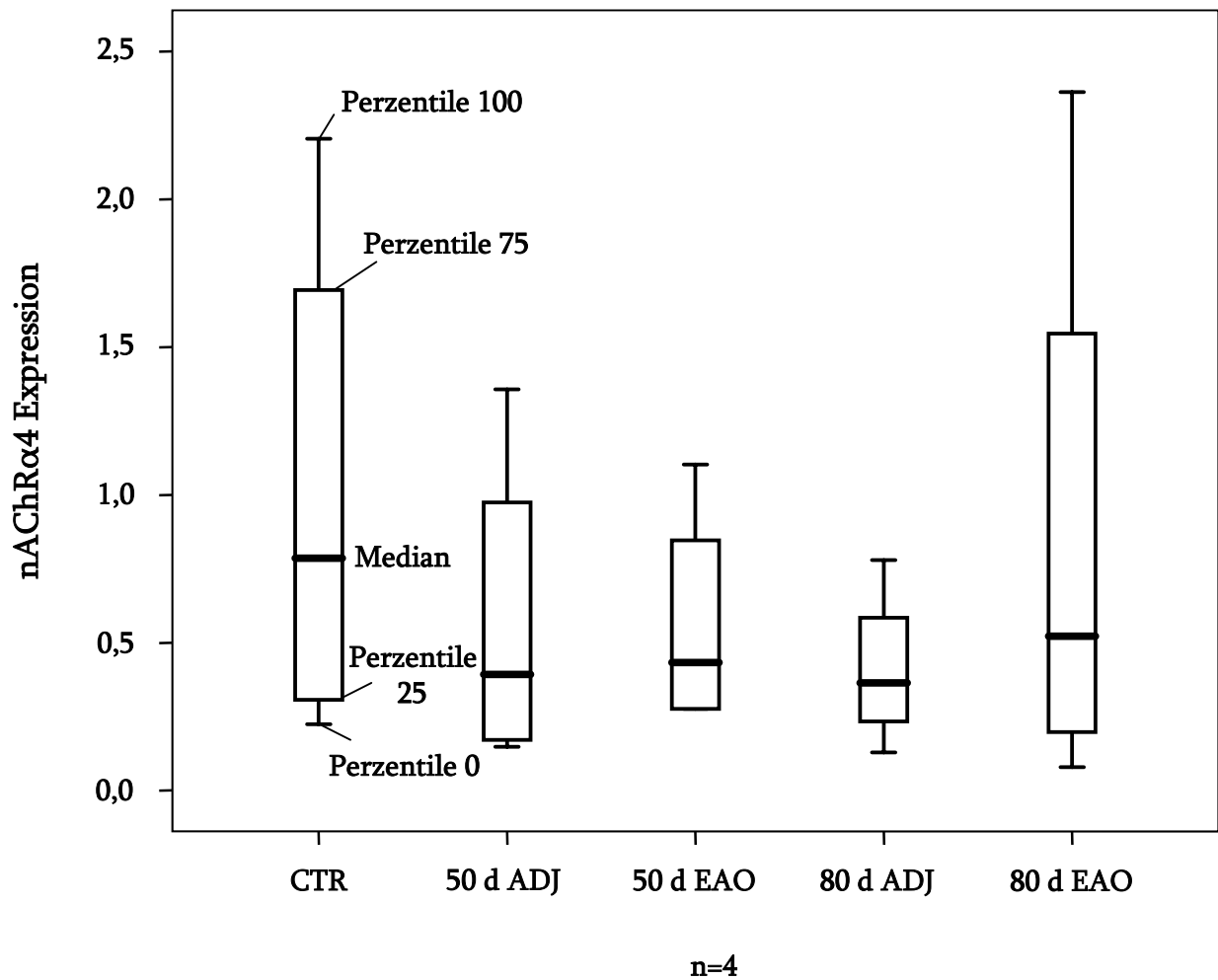


Abb. 3-41: Nachweis der nAChRα4-Untereinheit mRNA Expression mittels qRT-PCR-Analyse im Hoden von unbehandelten (CTR), EAO- und Adjuvans-Kontrolltieren (ADJ) 50 und 80 Tage (d) nach Behandlung. n = Anzahl der Tiere pro Gruppe. Darstellung im Boxplot mit Perzentile 0 (Minimum), 25, 75, 100 (Maximum) und dem Median (dicke schwarze Linie).

4. Diskussion

4.1 Nachweis der molekularen Komponenten des non-neuronalen cholinergen Systems in den männlichen Geschlechtsorganen

Die Vermutung, dass ein non-neuronales cholinerges System im Hoden existieren könnte und der Versuch dieses nachzuweisen, sind nicht neu. Bereits 1979 beschrieben Sastry und Sadavongvivad den Nachweis von Acetyl- und Propionylcholin, aber auch des synthetisierenden Enzyms Cholinacetyltransferase in Spermatozoen von Bullen und Menschen (Bishop et al., 1975, 1976). Ihrer Meinung nach wird ACh nicht in den Spermien gespeichert und es liegt auch nur eine sehr geringe Menge davon in den Zellen vor, so dass vermutlich das synthetisierte ACh sofort verbraucht wird ohne überhaupt gespeichert werden zu müssen.

Die Annahme, der Hoden besitze, wenn überhaupt, nur eine geringe cholinerge (parasymphatische) Innervation, wurde dadurch bestätigt, dass im Parenchym von Rattenhoden keinerlei PGP 9.5 positive Nervenfasern nachweisbar waren. In non-neuronalen Zellen an der Basis der Tubuli gelang hingegen der immunfluoreszenzmikroskopische Nachweis von PGP 9.5. Dies könnte ein Hinweis auf den neuroektodermalen Ursprung dieser Zellen sein. Auch das Bindegewebe, worüber Hoden und Nebenhoden in Verbindung miteinander stehen, ist reichlich mit PGP 9.5 positiven Nervenfasern versorgt (Schirmer et al., 2011).

Messungen an Rattenhoden bezüglich des Gehalts von Acetylcholin ergaben, dass sowohl Hoden von 16 Tage alten immaturen als auch von adulten Tieren ACh enthalten. Dabei ist die Menge im Hodenparenchym von immaturen Ratten (3.61 ± 1.32 pmol/mg Protein) deutlich niedriger als von adulten (3068.3 ± 764.94 pmol/mg Protein), in der Hodenkapsel vergleichbar niedrig (immaturer Rattenhoden: 6.33 ± 2.41 pmol/mg Protein, adulter Rattenhoden: 3.8 ± 1.62 pmol/mg Protein). Bei der Untersuchung von frisch isolierten Keimzellen aus adulten Ratten und dem Überstand des Zellmediums zeigte sich eine signifikant höhere Menge an ACh im Überstand (11.24 ± 3.65 vs. 47.74 ± 23.79 pmol/mg

Protein) (Messungen durchgeführt von Klein et al., Goethe-Universität Frankfurt, Daten aus Schirmer et al., 2011).

Der hohe Gehalt an ACh im Überstand des Zellmediums im Vergleich zu dem in isolierten Keimzellen lässt sich entweder damit erklären, dass Keimzellen fortwährend ACh synthetisieren und freisetzen ohne es zu speichern, oder aber dass testikuläre Makrophagen und Sertoli-Zellen, welche ebenfalls das synthetisierende Enzym und den hochaffinen Transporter besitzen, anstelle der Keimzellen ACh synthetisieren und freisetzen (Schirmer et al., 2011).

Der Unterschied im ACh-Gehalt zwischen immaturen und adulten Ratten könnte mit dem Aufbau des Tubulus bzw. Vorhandenseins verschiedener Zelltypen zusammenhängen. 16 Tage alte Ratten sind gerade in die Pubertät eingetreten und durchlaufen die erste Spermatogenesewelle. Ihr Hodenparenchym enthält noch nicht alle Keimzellen, welche ACh synthetisieren bzw. eventuell auch speichern. Pachytän-Spermatozyten sind zum Beispiel erst ab dem 20. Lebenstag vorhanden (Clermont & Perey, 1957; Russell, 1993). ACh scheint also für die Geschlechtsreife und somit für die Keimzellbildung eine Rolle zu spielen. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass alle Komponenten des cholinergen Systems in den non-neuronalen Zellen des Hodens nachweisbar sind. Dabei sind Pachytän-Spermatozyten und runde Spermatiden der häufigste Ursprungsort. Eine starke Expression zeigten das synthetisierende Enzym Cholinacetyltransferase und der hochaffine Cholintransporter-1 in Pachytän-Spermatozyten, runden Spermatiden und Residualkörperchen. Der Nachweis von ChAT gelang jedoch nicht in frühen Keimzellstadien und Spermatogonien sowie nur schwach in den Zellen des Interstitiums. ChT1 wird in Leydig-, Peritubulär-, Sertoli-Zellen und Spermatogonien relativ schwach exprimiert. Blutgefäße sind für ChAT immunfluoreszenzmikroskopisch stark positiv. Der vesikuläre Acetylcholin-Transporter fand sich nur in Pachytän-Spermatozyten und runden Spermatiden. All das lässt vermuten, dass die testikulären Zellen, welche ACh hauptsächlich synthetisieren, dieses auch speichern. Obwohl in Leydig-Zellen eine relativ niedrige mRNA Expression zu verzeichnen war, zeigten diese im immunfluoreszenzmikroskopischen Nachweis eine starke positive Reaktion für OCT2 und 3. In experimentell ausgelöster

Autoimmunorchitis konnte im Vergleich zu den Hoden unbehandelter Ratten und von Adjuvans-Kontrolltieren sowohl mittels RT-PCR-Analyse als auch Immunfluoreszenz eine Abnahme von ChAT, ChT1, VACht und OCT2 beobachtet werden.

Interessanterweise fanden Ibanez et al. (1991b) ChAT Transkripte in Hoden von Mensch und Ratte, die sich von dem mit neuronalem Ursprung (4.0 kb) unterschieden. Mithilfe der Northern Blot Analyse konnten sie im adulten Rattenhoden zwei ChAT Transkripte mit 3.5 und 1.3 kb, im menschlichen Hoden eine ChAT mRNA mit 3.2 kb identifizieren. Auch wenn beide Transkripte im Rattenhoden vermutlich das gleiche 5' Ende besitzen, kann das kleinere von beiden aufgrund seines Aufbaus nicht für ein funktionsfähiges ChAT Protein kodieren. In späteren Versuchen stellten Lönnerberg & Ibanez (1999) sogar fest, dass auch das 3.5 kb-Transkript nicht in der Lage ist für ein komplettes und wirksames ChAT Enzym zu kodieren. Welche Funktion diese Transkripte im Hoden haben und welches Enzym stattdessen für die Synthese von ACh verantwortlich ist, bleibt jedoch ungeklärt.

Auch wenn nicht ausgeschlossen werden kann, dass die ACh synthetisierenden Komponenten im Hoden, wie von Lönnerberg & Ibanez (1999) propagiert, funktionslos sind, konnte im Rahmen unserer Expressionsanalysen gezeigt werden, dass sowohl mRNA als auch Protein für die Synthese von ACh vorhanden sind. Des Weiteren gelang der Nachweis von ACh in Rattenhoden und isolierten Keimzellen. Der in isolierten Zellen (ca. 11 pmol/mg Protein) und im Überstand (ca. 48 pmol/mg Protein) gemessene Gehalt an ACh ist durchaus vergleichbar mit dem anderer non-neuronaler Zellen. Im Hinblick auf das Fehlen von Nervenfasern weisen die aufgeführten Ergebnisse auf einen non-neuronalen Ursprung des ACh direkt im Rattenhoden hin (Schirmer et al., 2011).

Allerdings müssen die Versuche zum Nachweis der ChAT aufgrund der hohen Aktivität der Carnitinacetyltransferase im Hoden, welche ebenfalls Cholin als Substrat nutzt, durchaus kritisch betrachtet werden (Goodman & Harbison, 1981; Goodman et al., 1984).

Ein versehentlicher Nachweis der CarAT durch die verwendeten ChAT-Primer kann aufgrund der im Vorfeld durchgeführten Versuche der Arbeitsgruppe Kardiopulmonale Neurobiologie unter der Leitung von Professor Kummer ausgeschlossen werden.

Bei der in situ Hybridisierung wiesen Ibanez et al. (1991b) als ChAT positive Zellen Spermatozyten und Spermatiden nach. In Sertoli-Zellen, Spermatogonien und im Interstitium gelang dies nicht. Auch das steht im Gegensatz zu den Ergebnissen dieser Arbeit. Zwar hatten auch hier vor allem Pachytän-Spermatozyten, runde Spermatiden und Residualkörper die höchste mittels RT-PCR-Analyse nachgewiesene ChAT mRNA Expression, jedoch gelang der Nachweis nur in Spermatogonien nicht. Ähnlich verhielt es sich auch mit dem immunfluoreszenzmikroskopischen Nachweis.

4.2 Funktion und Bedeutung des non-neuronalen cholinergen Systems im Hoden

Isolierte Granulosazellen von Mensch und Ratte produzieren ACh und enthalten VChT (Fritz et al., 1999, 2001; Mayerhofer & Fritz, 2002). Aufgrund ihrer Lage im avaskulären Kompartiment des Follikels haben Oozyten und Granulosazellen keinen Kontakt zu Nervenfasern (Mayerhofer et al., 2003; Mayerhofer & Kunz, 2005). Auch wird davon ausgegangen, dass keine cholinerge (parasymphatische) Innervation des Ovars von Ratte, Affe und Mensch existiert (Mayerhofer & Fritz, 2002). Da all diese Verhältnisse denen im Hoden entsprechen, liegt ein Vergleich nahe.

4.2.1 Proliferation und Differenzierung von Keimzellen

Bei der Frage nach der Funktion und Bedeutung eines non-neuronalen cholinergen Systems im Hoden können Ergebnisse von Versuchen am Ovar, Produktionsstätte von weiblichen Keimzellen, Hinweise geben. Zellproliferation und Differenzierung finden im Rahmen des Follikelwachstums, der Ovulation und der Bildung des Corpus luteum statt (Mayerhofer & Fritz, 2002). Das synthetisierende Enzym ChAT konnte in kultivierten Granulosazellen von Nagetieren und Primaten, nicht aber in Nervenfasern oder Nervenzellen des Ovars nachgewiesen werden. Dabei handelte es sich vor allem um Granulosazellen von heranreifenden Tertiärfollikeln, weshalb der Einfluss von FSH angenommen wurde (Fritz et al., 1999, 2001; Mayerhofer & Fritz, 2002; Mayerhofer & Kunz, 2005). Mayerhofer et al. (2006) bestätigten diese Vermutung durch GFSHR-17 Zellen aus Ratten, welche kontinuierlich den FSH-Rezeptor exprimierten und auf FSH mit einem signifikanten Anstieg

der ACh-Produktion reagierten. Des Weiteren blieb ein immunreaktiver Nachweis für ChAT in neonatalen und postnatalen Ovarien von Ratten, in neonatalen Ovarien von Affen und denen von Ratten- und Mausembryonen aus (Mayerhofer et al., 2006). ACh scheint erst im weiteren Verlauf für die Proliferation der Follikel eine Rolle zu spielen.

So wie die Granulosazellen im Ovar eine wesentliche Rolle für die weibliche Keimzellentwicklung spielen, so entscheidend sind auch die Sertoli-Zellen für die Entwicklung des Hodens und die Bildung der männlichen Keimzellen.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit gelang der Nachweis von ChAT bis auf in Spermatogonien in allen untersuchten isolierten Zellen des Hodens. Ein besonderes Augenmerk liegt auf den Sertoli-Zellen, welche wie die Granulosazellen im Ovar unter dem Einfluss von FSH stehen. Die Sertoli-Zellen besitzen FSH-Rezeptoren, über die sie zur Sekretion von Inhibin B und Androgen-bindendem Protein (ABP) stimuliert werden. Unter dem Einfluss von FSH fördern sie die Proliferation und Differenzierung der Keimzellen (Holstein, 2003). Die von Professor Klein ermittelten Daten im Rattenhoden zeigen, dass der ACh-Gehalt im Hodenparenchym von immaturen Ratten (3.61 ± 1.32 pmol/mg Protein) deutlich unter dem von adulten (3068.3 ± 764.94 pmol/mg Protein) liegt (Schirmer et al., 2011). Dadurch, dass im Rahmen dieser Arbeit nur adulte Ratten untersucht wurden, kann bezüglich der ChAT-Expression bei immaturen Tieren nur spekuliert werden. Denkbar wäre, dass FSH wie bei den Granulosazellen im Ovar, bei adulten Tieren eine Auswirkung auf die ACh-Produktion bzw. die Expression von ChAT in Sertoli-Zellen hat. Es könnte aber auch sein, dass immature Ratten noch nicht alle Keimzellen, welche ACh synthetisieren bzw. speichern wie z.B. Pachytän-Spermatozyten, besitzen, weshalb die ChAT-Expression vermindert oder nicht vorhanden ist. Scheinbar spielt ACh für die Geschlechtsreife und somit für die Keimzellbildung eine Rolle.

Immunhistochemisch ließ sich ChAT in Granulosazellen von gesunden Tertiärfollikeln aus Rhesusaffe, Mensch und Ratte nachweisen, jedoch nicht mittels RT-PCR (Fritz et al., 2001). Diese Problematik unterstützt die These von Lönnerberg & Ibanez von unbekannten Splicevarianten der ChAT oder gar eines anderen ACh synthetisierenden Enzyms wie z.B. der Carnitinacetyltransferase aufgrund ihrer Homologie zu ChAT. Die CarAT ist ebenfalls in

der Lage ACh zu synthetisieren und in Spermien von Säugetieren vorhanden (Day-Francesconi & Casillas, 1982), weshalb sie für die ACh-Produktion eine größere Rolle spielen könnte als ChAT (Goodman & Harbison, 1981; Goodman et al., 1984).

4.2.2 Spermato- und Spermiogenese

Effekte von Gonadotropinen und Androgenen werden über Sertoli-Zellen an die Keimzellen vermittelt. Die Proliferation und somit die Zahl der Sertoli-Zellen ist abhängig von FSH, von der Sertoli-Zellzahl wiederum die Menge an Keimzellen. FSH reguliert die DNA-Synthese in Spermatogonien sowie deren Proliferation und Differenzierung vermutlich über die Induktion des Stammzellfaktors in Sertoli-Zellen. Der Einfluss von FSH scheint dabei, wie zumindest klinische und experimentelle Studien zeigen, primär quantitativ zu sein, d.h. unter FSH-Mangel werden weiterhin Spermatozoen gebildet, jedoch eine geringere Anzahl (Rey, 2003). Wie bereits beschrieben könnte ACh in direktem Zusammenhang mit FSH und dessen Einfluss auf Proliferation und Differenzierung stehen.

FSH reguliert ebenfalls die Spermiogenese, also die Differenzierung von Spermatiden zu Spermatozoen (Elongation, Ausbildung des Flagellums) (Rey, 2003). Tatsächlich waren auch runde Spermatiden in den von uns durchgeführten Untersuchungen einer der häufigsten Ursprungsorte für ACh. Dies legt nahe, dass ACh FSH abhängig produziert bzw. für die weitere Differenzierung von Spermatiden zu Spermatozoen benötigt wird.

In Abhängigkeit von LH differenzieren sich Leydig-Zellen und produzieren Testosteron. Intratestikuläre Testosteronspiegel sowie die Expression des Androgenrezeptors in Sertoli-Zellen sind unabdingbar für den Eintritt der Keimzellen in die Meiose und somit für die Spermatogenese. Fehlende Androgene führen zu einem prämeiotischen Stop der Spermatogenese. Das Pachytänstadium ist dabei am stärksten Androgen empfindlich (Rey, 2003). Der Einfluss von Androgenen auf das non-neuronale cholinerge System bestätigt sich in der Beobachtung, dass in den Pachytän-Spermatozyten mit am häufigsten der Nachweis der molekularen Komponenten gelang.

Sowohl Androgene als auch die Hypophyse haben einen Einfluss auf die ChAT mRNA Expression. So nahm diese durch Zerstörung der Leydig-Zellen, Produktionsstätte von Testosteron, ab. Der Effekt der Abnahme des 1.3 kb- und der Zunahme des 3.5 kb-

Transkripts nach Hypophysektomie konnte durch Testosteronsubstitution verhindert werden (Ibanez et al., 1991b). Favaretto et al. (1993) konnten an gereinigten Leydig-Zellen der Ratte zeigen, dass cholinerge Agonisten (Acetylcholin, Carbachol und Nikotin) einen inhibitorischen Effekt auf die Testosteronfreisetzung haben und im Gegenzug nikotinische Antagonisten diesen teilweise wieder aufheben konnten. Ob es sich dabei um eine Art Rückkopplungseffekt handelt, bleibt weiter zu erforschen.

Insgesamt scheint ACh eine entscheidende Rolle für die Hypophysen-Gonaden-Achse und somit auch für die Spermato- und Spermiogenese zu spielen.

4.2.3 Gap Junctions

In nahezu allen Epithelien werden zwischen verschiedenen Zelltypen Gap Junctions ausgebildet. Diese Zell-Zell-Kontakte bestehen aus zwei Halbkanälen, sog. Connexonen, wobei jede Zelle einen Halbkanal beisteuert. Diese Connexone sind wiederum aus sechs Proteinuntereinheiten, den Connexinen, aufgebaut. Beim Menschen sind 20, in Nagetieren 19 verschiedene Connexine bekannt (Willecke et al., 2002). Neben Adherens Junctions aus Cadherinen und Tight Junctions aus Occludin sind auch Gap Junctions Teil der Blut-Hoden-Schranke (Pointis & Segretain, 2005).

Connexin 43 ist das bisher am häufigsten vorkommende Connexin in Säugetieren. Es wird in mindestens 35 verschiedenen Geweben und somit über 35 Zelltypen wie z.B. Kardiomyozyten, Keratinozyten, Astrozyten, Endothelzellen, glatten Muskelzellen, Leydig-Zellen und Sertoli-Zellen verschiedener Spezies exprimiert (Laird, 2006). Seine Expression wird außerdem von Androgenen gesteuert (Weinbauer et al., 2009).

In verschiedenen Zelltypen konnte gezeigt werden, dass Gap Junctions an Zellteilung, Wachstum und Apoptose beteiligt sind.

Im Hoden scheinen sie und die dort vorherrschende Proteinuntereinheit Connexin 43 eine entscheidende Rolle für die Entwicklung und Reifung von Spermatozoen zu spielen (Pointis et al., 2005). Connexin 43 konnte im Hoden in Leydig- und Peritubulär-Zellen nachgewiesen werden (Risley et al., 1992; Risley, 2000). Auch die Reifung und Funktion der Sertoli-Zellen wird wesentlich über Connexin 43 gesteuert (Weinbauer et al., 2009). Innerhalb der Tubuli ist Connexin 43 ein Bestandteil der Zell-Zell-Kontakte zwischen Sertoli-Zellen

untereinander, zwischen Sertoli-Zellen und Spermatogonien und zwischen Sertoli-Zellen und primären Spermatozyten (Risley et al., 1992; Batias et al., 1999, 2000; Pointis & Segretain, 2005). Bei Connexin 43-Mangel teilen sich die Sertoli-Zellen kontinuierlich weiter, was dazu führt, dass die Spermatogenese nicht fortschreiten kann, sondern auf der Ebene der Spermatogonien sistiert (Weinbauer et al., 2009). Des Weiteren entfällt möglicherweise die Versorgung der Keimzellen von Seiten der Sertoli-Zellen und somit ihr Überleben. Normalerweise wird dies dadurch gesichert, dass Gap Junctions entweder den Fluss von nekrotischen und/oder apoptotischen Signaleffektoren regulieren oder die Diffusion von Vitalsignalen fördern (Krysko et al., 2005).

Connexin 43 beeinflusst also nicht nur die testikuläre Entwicklung und Zelldifferenzierung, sondern auch Beginn und Aufrechterhaltung der Spermatogenese und somit Überleben der Keimzellen (Brehm et al., 2007). Brehm et al. (2007) zeigten mit einem Knockout-Modell, bei welchem das Connexin 43-Gen ausschließlich in den Sertoli-Zellen fehlte, dass diese Mäuse zwar einen normalen Descensus testis und eine normale Entwicklung des Urogenitaltrakts aufwiesen, jedoch aufgrund des Ausfalls der Spermatogenese Größe und Gewicht der Hoden drastisch verringert waren. Histologisch und molekularbiologisch war eine signifikante Reduktion der Zellzahlen von Spermatogonien pro Tubulus, im Gegenzug aber erhöhte Sertoli-Zellzahlen pro Tubulus zu verzeichnen. Außerdem wurden Verlust und/oder Abnahme der runden und elongierten Spermatozyten sowie eine Hyperplasie der Leydig-Zellen beobachtet. Auch im menschlichen Hoden wird bei Connexin 43-Mangel die Spermatogenese beeinträchtigt (Steger et al., 1999; Defamie et al., 2003).

Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass Connexin 43 absolut notwendig für die Spermatogenese, verantwortlich für Beginn und Abschluss der Mitose in Spermatogonien und die Regulierung der Sertoli-Zellproliferation und -maturation ist. Außerdem ist es einzigartig in seiner regulatorischen und physiologischen Wirkung und kann nicht durch andere Connexine ersetzt werden. Ob ein Verlust des Connexin 43-Gens in Keimzellen ähnliche Folgen für die Spermatogenese hat wie in Sertoli-Zellen, muss mithilfe eines passenden Knockout-Modells für Keimzellen herausgefunden werden.

Granulosazellen exprimieren neben ChAT auch den Proliferationsmarker PCNA (proliferating cell nuclear antigen) (Mayerhofer & Fritz, 2002). Allerdings ist eine Proliferation nur dann möglich, wenn Gap Junctions aufgehoben werden (Sommersberg et al., 2000). Selbst isolierte menschliche Granulosazellen behalten die starke Verbindung über Gap Junctions wie Granulosazellen im wachsenden Follikel bei (Fritz et al., 2002). Fritz et al. (2002) zeigten, dass unter Stimulation mit cholinergen Substanzen die Serin-Phosphorylierung von Connexin 43 zunimmt und so Gap Junctions beeinflusst werden können. Diese Phosphorylierung führt durch Blockierung der Gap Junctions zur Störung der interzellulären Kommunikation der Granulosazellen untereinander, wodurch sie dem funktionellen Synzytium des Follikels entkommen und proliferieren können (Mayerhofer & Kunz, 2005). Im Gegensatz dazu verstärkt FSH in Granulosazellen, welche stets den FSH-Rezeptor exprimieren, die Kopplung durch Gap Junctions und verhindert so Proliferation, fördert aber Differenzierung (Sommersberg et al., 2000).

Während der Spermatogenese ist die interzelluläre Kommunikation der Sertoli-Zellen untereinander, aber auch zwischen Sertoli-Zellen und Keimzellen extrem wichtig, weshalb in dieser Phase die Intaktheit und Stabilität von Gap Junctions notwendig ist.

Im Bereich der Blut-Hoden-Schranke sind Tight und Gap Junctions sowie Connexin 43 Teil des basalen tubulobulbären Komplexes (Du et al., 2013). Im Stadium VII der Spermatogenese der Ratte werden sie weniger stark exprimiert. Es wird vermutet, dass die Anzahl der Zellkontakte reduziert wird, kurz bevor Spermatozyten im Stadium VIII-IX der Spermatogenese ihre Position verändern (Du et al., 2013; Russell, 1979). Ob ACh einen Einfluss auf Gap Junctions und somit die Passage der Präleptotän-Spermatozyten durch die Blut-Hoden-Schranke hat, bleibt zu klären.

4.2.4 Spermienmotilität

Ergebnisse von Untersuchungen an zilientragenden Zellen des Bronchialsystems können Hinweise auf den Einfluss von ACh auf die Beweglichkeit u.a. auch von Spermien geben. Aus menschlichen Bronchien isolierte zilientragende Zellen exprimieren ChAT und synthetisieren ACh, weshalb nahe liegt, dass die ziliare Aktivität über ACh reguliert wird (Klapproth et al., 1997; Reinheimer et al., 1998a). An Biopsien von menschlichem Tracheal-

und Bronchialepithel konnte der stimulierende und hemmende Effekt muskarinischer Agonisten (Methacholin) und Antagonisten (Atropin) auf die ziliare Aktivität gezeigt werden (Wong et al., 1988a+b). Auch Kordik et al. konnten bereits 1952 nachweisen, dass niedrige Konzentrationen von Acetylcholin bzw. des Cholinesteraseinhibitors Physostigmin die Beweglichkeit von Zilien erhöhten und hohe Konzentrationen diese verminderten.

Entweder führt die gepulste Änderung des Acetylcholingehalts in der Zelle durch intra- und/oder transzelluläre Translokation von ACh, möglicherweise durch die Cholinesterase ausgelöst, zu einem schlagartigen Permeabilitätsunterschied (durch erhöhten Natrium- und/oder Calciueinstrom) und steuert somit die Beweglichkeit oder ACh aktiviert direkt die kontraktilen Mikrotubuli (Wessler et al., 1998). Sicher ist, dass sowohl die Aktivität der Proteinkinase A, die Aktivität von cAMP und cGMP als auch der Anstieg intrazellulären Calciums eine Rolle für die ziliare Aktivität spielen (Wanner et al., 1996).

Da Acetylcholin sowohl in zilientragenden Protozoen als auch in Spermien von Säugern nachgewiesen wurde, könnte seine Aufgabe darin bestehen, die Bewegung dieser auszulösen und aufrechtzuerhalten (Wessler et al., 1998). Die Tatsache, dass sowohl ChAT als auch AChE in hohen Konzentrationen in den Spermienchwänzen zu finden sind, verstärkt diese Vermutung. Bei genaueren Untersuchungen der einzelnen Spermienabschnitte (Kopf, Mittelstück, Schwanz) in Bullen zeigte sich, dass, obwohl alle Fraktionen signifikante Mengen sowohl an ChAT als auch an AChE enthielten, die in den Spermienchwänzen fünfmal höher war als in Kopf und Mittelstück. Des Weiteren wurde die Beweglichkeit von Spermien durch Inhibitoren der ChAT wie z.B. 2-Benzoylthyltrimethylammonium um 80% nach 5 min und um 95% nach einer Stunde vermindert, was ebenfalls für eine Beteiligung des cholinergen Systems an der Spermienmotilität spricht (Sastry & Sadavongvivad, 1979). Sanyal & Khanna (1971) machten bei menschlichen Spermien die Beobachtung, dass ACh auf verschiedene Typen von Spermatozoen, die einen mit rundem, die anderen mit ovalem Kopf, unterschiedliche Wirkung hat. So ändert sich zwar nichts an der Gesamtmotilität, d.h. gleich viele Zellen passieren das mikroskopische Feld in einer Zeiteinheit, jedoch erhöht sich die Anzahl der oval geformten Spermien, während die der runden abnimmt. Mit zunehmender Konzentration von ACh nimmt auch die Beweglichkeit der ovalen Zellen zu.

Nanomolare und niedrige mikromolare Konzentrationen von ACh, aber auch Nikotin, stimulieren *in vitro* in verschiedenen Spezies die Spermienbeweglichkeit durch Erhöhung der Schwimgeschwindigkeit, der Schlagfrequenz des Flagellums, durch Änderungen im Schwimmverhalten und der Chemotaxis (Nelson, 1972; McGrady & Nelson, 1976; Dwivedi & Long, 1989; Sliwa, 1995). Bei ausreichend hohem Spiegel inhibieren Antagonisten wie α -Bungarotoxin die Spermienbeweglichkeit und die Wirkung von ACh oder Nikotin (Nelson, 1976; Placzek et al., 1988). Ca^{2+} ist der wichtigste Faktor für den Beginn und die Aufrechterhaltung der Beweglichkeit und entscheidend für die Hyperaktivierung von Spermien (Suarez & Ho, 2003). In mikromolaren Mengen fördert ACh über die nAChR α 7-Untereinheit den Einstrom von Ca^{2+} in das Mittelstück und den Kopf von menschlichen Spermien (Bray et al., 2005, nicht publizierte Daten).

Denkbar wäre allerdings auch, dass das non-neuronale cholinerge System des Ovars einen Einfluss auf die Funktion und Beweglichkeit der in die Zona pellucida eindringenden Spermien hat.

4.2.5 Akrosomenreaktion

In dieser Arbeit gelang der Nachweis der nAChR α 7-Untereinheit mittels RT-PCR-Analyse, bis auf für runde Spermatiden und Residualkörper, in allen anderen isolierten Zellen des Hodens. Die stärkste Expression war in den Pachytän-Spermatozyten zu verzeichnen. Auch Meizel (2004) beschreibt das Vorkommen nikotinischer Acetylcholinrezeptoren in Spermien von Säugetieren, welche die Funktionen dieser beeinflussen. Western Blot Ergebnisse zeigen das Vorhandensein der nAChR α 7-Untereinheit in menschlichen Spermien (Son & Meizel, 2003). Die Bindung der Antagonisten α -Bungarotoxin, α -Conotoxin IMI und Methylylcaconitin an nAChR führt zur Blockade des Einsetzens der Akrosomenreaktion in menschlichen (im Ejakulat) und Mäusespermien (im Nebenhoden). Da nAChR α 7 als einzige Rezeptoruntereinheit alle drei Antagonisten bindet, ist anzunehmen, dass die Hemmung der Akrosomenreaktion über diese vermittelt wird (Bray et al., 2002b; Son & Meizel, 2003). Die nAChR α 7-Untereinheit ist vermutlich zusammen mit dem Glycinrezeptor, welcher immunfluoreszenzmikroskopisch in Spermien von Schweinen und Mäusen nachgewiesen

wurde (Melendrez & Meizel, 1996; Sato et al., 2000a), auch für die Depolarisierung, die entscheidend für die Akrosomenreaktion ist, verantwortlich (Meizel, 2004). Wenn einer der beiden Rezeptoren inhibiert wird, bleibt die Akrosomenreaktion aus (Sato et al., 2000b; Bray et al., 2002a, b; Son & Meizel, 2003). Eine Erhöhung des intrazellulären Calciumspiegels, entweder durch die Freisetzung aus intrazellulären Speichern oder durch die mittels Depolarisation gesteuerte Öffnung spannungsabhängiger Calciumkanäle, ist notwendig für die Akrosomenreaktion (Jungnickel et al., 2001; O'Toole et al., 2000). Die Membrandepolarisation in menschlichen Spermien erfolgt mithilfe eines Natrium- und/oder Calciumeinstroms via des nAChR α 7 (Bray et al., 2002b). nAChR α 7-Homomere besitzen eine höhere Permeabilität für Ca^{2+} , was für die Akrosomenreaktion bedeutend ist (Meizel, 2004). Die Akrosomenreaktion konnte in menschlichen Spermien (Ejakulat) sowohl durch ACh als auch Nikotin, in Mäusespermien (Nebenhoden) nur durch ACh *in vitro* ausgelöst werden (Bray et al., 2002b; Son & Meizel, 2003).

Die nAChR α 7-Untereinheit, welche auf Spermien von Mäusen exprimiert wird, ist vor allem im Mittelstück, aber auch entlang des kompletten Flagellums lokalisiert. Spermien von Mäusen ohne nAChR α 7 zeigen Störungen in der Motilität, eine herabgesetzte Hyperaktivierung (Bray et al., 2005) und keine Akrosomenreaktion, weder durch ACh noch durch die Zona pellucida ausgelöst (Meizel & Son, 2005).

Der bereits beschriebene Mechanismus des über die nAChR α 7-Untereinheit geförderten Ca^{2+} -Einstroms in das Mittelstück und den Kopf von menschlichen Spermien (siehe 4.2.4) könnte für Pachytän-Spermatozyten, welche die nAChR α 7-Untereinheit und weitere Komponenten des cholinergen Systems wie ChAT, ChT1, VAChT, OCT2 exprimieren, wichtig sein. Warum allerdings in Pachytän-Spermatozyten und Spermien nAChR α 7 nachgewiesen werden konnte, in runden Spermatiden und Residualkörpern jedoch nicht, bleibt unklar. Dadurch, dass sie in Spermien u.a. für die Motilität und die Akrosomenreaktion verantwortlich ist, wundert es nicht, dass diese Rezeptoruntereinheit von runden Spermatiden nicht exprimiert wird. Die Klärung der Funktion in Pachytän-Spermatozyten erfordert jedoch noch weitere Untersuchungen.

4.3 Spezifische Rollen einzelner molekularer Komponenten des non-neuronalen cholinergen Systems in den männlichen Geschlechtsorganen

Wir wiesen mittels PCR eine signifikante Expression der mRNA von ChAT, ChT1, VACHT und OCT2 im Hodenparenchym nach (Schirmer et al., 2011). Nach dem Entfernen der Hodenkapsel lag das Expressionsmuster in der Reihenfolge ChAT > ChT1 > OCT2 > VACHT vor. Die Untersuchung isolierter Populationen testikulärer Zellen ergab eine mäßige bis hohe Expression von mRNA für ChAT, ChT1, VACHT und OCT2 in Pachytän-Spermatozyten, runden Spermatiden und abgesehen von VACHT auch in Residualkörperchen. Im Gegensatz dazu fehlte bzw. war der Nachweis in Sertoli-Zellen, Peritubulär-Zellen sowie Spermatogonien sehr gering. ChAT und ChT1 waren in RNA von isolierten testikulären Makrophagen vorhanden, ChAT und OCT2 in Leydig-Zellen.

Immunfluoreszenzmikroskopisch zeigten Spermatiden und Spermatogonien eine starke positive Reaktion für ChAT und ChT1, für OCT2 hingegen nur Leydig-Zellen (Schirmer et al., 2011).

4.3.1 Einfluss nikotinischer Rezeptoren auf die Fertilität

Die von Sylvia Schirmer in unserer Arbeitsgruppe durchgeführten Experimente zeigten eine mRNA Expression der nAChR-Untereinheiten im Hodenparenchym in der Reihenfolge $\alpha 4 > \alpha 7 > \alpha 5 > \alpha 9$ und in der Hodenkapsel mit einer Häufigkeitsverteilung $\alpha 4 > \alpha 7 > \alpha 5 > \alpha 2$. Für die Untereinheiten nAChR $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 6$ und $\alpha 9$ konnte ein signifikanter Unterschied im Expressionsmuster zwischen Parenchym und Kapsel beobachtet werden. So war die relative Expression von nAChR $\alpha 2$ und $\alpha 6$ in der Kapsel signifikant höher, wohingegen nAChR $\alpha 3$, $\alpha 4$ und $\alpha 9$ seltener als im Parenchym exprimiert wurden. Das Vorkommen von $\beta 1$ - $\beta 3$ war in Kapsel und Parenchym gleich, $\beta 4$ fand sich nur in der Kapsel (Schirmer et al., 2011).

Die Expression der nAChR $\alpha 7$ -Untereinheit fand sich in Spermatogonien, Spermatozyten, aber auch in den Sertoli-Zellen. Spermatogonien und Spermatozyten exprimierten auch die nAChR $\alpha 4$ -Untereinheit, wahrscheinlich als Teil des heteromeren $\alpha 4\beta 2$ Rezeptors, welcher einen der häufigsten nAChR Subtypen in Nervengewebe darstellt (Albuquerque et al., 2009).

Der ungünstige Effekt des Rauchens auf die reproduktiven Funktionen wie Frühgeburtslichkeit und Abort sind hinreichend bekannt. Beim Mann führt Nikotin als Hauptbestandteil des Zigarettenrauchs zu einer Einschränkung der Spermatogenese und Steroidhormonbiosynthese. Letzteres vermutlich durch Beeinflussung des StAR-Proteins (Steroidogenic acute regulatory protein), welches den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt für die Steroidhormonbiosynthese darstellt (Gocze & Freeman, 2000; Bose et al., 2007). Allerdings könnte durch die Identifizierung der $\alpha 4$ - und $\alpha 7$ -nAChR-Untereinheiten mRNA in Leydig-Zellen im Rahmen dieser Arbeit ein weiterer Mechanismus zur Beeinflussung der Androgensynthese gefunden worden sein.

Andere nAChR-Untereinheiten scheinen keinen direkten Einfluss auf die Fertilität zu haben, da Mäuse mit fehlerhaften Untereinheiten $\alpha 4$, $\beta 2$ (Marubio et al., 1999), $\alpha 5$ (Wang et al., 2002) und $\beta 4$ (Wang et al., 2003a) keine Auffälligkeiten bezüglich Wurfgröße oder Fruchtbarkeit zeigten.

4.3.2 Stadienspezifische Expression des hochaffinen Cholintransporters-1

Beim immunfluoreszenzmikroskopischen Nachweis des hochaffinen Cholintransporters-1 im unbehandelten Hoden fiel auf, dass Präleptotänspermatozyten in Tubuli der Stadien VIII und höher eine positive Reaktion zeigten. In Tubuli der Stadien I-VI waren keine Zellen positiv. Nach der letzten Mitose der Typ B-Spermatogonien im Stadium VI entstehen Präleptotänspermatozyten. Diese vervielfältigen ihre DNA vom Ende des Stadiums VII bis zum Stadium VIII und leiten so die Meiose ein. Im mittleren Pachytän (Stadium VI-VIII) zeigen die meiotischen Chromosomen eine diffuse Struktur, was eine signifikante Erhöhung der Transkriptionsrate widerspiegelt. Während der späten Schritte der Reifung bilden die Spermatiden eine durchgehende Schicht entlang des Lumens des Tubulus, sichtbar in den Stadien VII und VIII. Die Spermiation beginnt im Stadium VIII. Dabei spaltet sich das Zytoplasma vom Spermatid ab und bildet einen Residualkörper, welcher anschließend von den Sertoli-Zellen phagozytiert wird (Parvinen, 1982). Die Expression von ChT1 vor allem im Stadium VIII gibt einen Hinweis auf den möglichen Einfluss von ACh auf Meiose, Spermatogenese und Spermiation.

In den Stadien XIII-V sind die Bindung von FSH und die Aktivierung der FSH-abhängigen Adenylatcyclase in den Sertoli-Zellen am stärksten, die Stadien VII und VIII scheinen dagegen nahezu unempfindlich gegenüber FSH zu sein. Stattdessen liegen hier die maximale Konzentration an endogenem Testosteron und die maximale Sekretionsrate des Androgen-bindenden Proteins (ABP) vor. In diesen Stadien wird auch am stärksten die Meiose-induzierende Substanz (MIS) sezerniert (Parvinen, 1982).

Interessanterweise kommt es nach Hypophysektomie nicht zu einer gleichmäßigen Degeneration aller Keimzellarten, sondern es sind nur einzelne Schritte der Spermatogenese betroffen. Pachytänspermatozyten und Schritt 7 und 19 Spermatiden in den Stadien VII und VIII degenerieren, was jedoch durch die Gabe von LH verhindert werden kann (Parvinen, 1982). Es ist daher denkbar, dass ChT1 unter dem Einfluss von Androgenen steht.

Während der Stadien VII und VIII unterliegen die Keimzellen einer Vielzahl an tiefgreifenden metabolischen Veränderungen sowie Änderungen in den interzellulären Verbindungen (Parvinen, 1982). Spermatogonien, welche außerhalb der Blut-Hoden-Schranke lokalisiert sind, müssen sich zu Präleptotän-/Leptotänspermatozyten differenzieren, welche dann vom basalen zum luminalen Kompartiment des Tubulusepithels, die Blut-Hoden-Schranke passierend, im späten Stadium VIII bzw. frühen Stadium IX migrieren (Russell, 1977; Yan et al., 2008). Mithilfe des nur in Stadium VII und VIII sezernierten Plasminogenaktivators können sie die Tight Junctions zwischen den Sertoli-Zellen nach temporärer Öffnung passieren. Dieser Plasminogenaktivator scheint auch für die Abgabe der reifen Spermatiden aus dem Tubulusepithel ins Lumen im Stadium VIII eine entscheidende Rolle zu spielen (Parvinen, 1982).

4.3.3 Geschlechtsspezifität der organischen Kationentransporter

OCT1 der Ratte wird in Leber und Niere exprimiert (Gründemann et al., 1994), OCT2 hingegen nur in der Niere (Okuda et al., 1996). OCT3 ist vor allem in der Plazenta nachweisbar, aber auch in Darm, Herz, Gehirn und Lunge und nur in sehr geringen Mengen in der Niere (Kekuda et al., 1998).

Bei Untersuchungen an der Niere zur Aufnahme von organischen Kationen konnte gezeigt werden, dass Nieren von männlichen Ratten Tetraethylammonium stärker aufnehmen als

die von weiblichen (Bowman & Hook, 1972), was auf einen geschlechtsspezifischen Unterschied hindeutet. Urakami et al. (1999) fanden heraus, dass OCT2, nicht jedoch OCT1 bzw. OCT3, in Nieren von männlichen Ratten wesentlich höher exprimiert wird als in weiblichen und vermutlich für die Geschlechtsspezifität verantwortlich ist. Die Behandlung von männlichen und weiblichen Ratten mit Testosteron führte außerdem zu einer signifikanten Erhöhung der Expression von rOCT2 mRNA und Protein in der Niere, Östradiol hingegen zu einer mäßigen Abnahme der Expression bei männlichen Tieren, jedoch nicht bei weiblichen. Für rOCT1 konnte dieser Einfluss nicht nachgewiesen werden (Urakami et al., 2000).

Diese Ergebnisse weisen auf die wichtige Rolle hin, die Testosteron bei der Regulation der Transkription von OCT2 spielt. Androgene, wie Testosteron, sind die wichtigsten Hormone für die Ausprägung des männlichen Phänotyps (Lee & Chang, 2003). Über einen spezifischen intrazellulären Androgenrezeptor und die Androgen responsiven Elemente ARE-1 und 3 wird die Promotoraktivität von OCT2 stimuliert. Weder die Promotorregion von rOCT1 noch von rOCT3 besitzen ARE-homologe Sequenzen, was die fehlende Wirkung von Testosteron erklärt (Asaka et al., 2006). Die rOCT2 mRNA Expression in anderen Organen wie Leber oder Kleinhirn weist keinen geschlechtsbezogenen Unterschied auf (Slitt et al., 2002).

Die stärkere Expression von OCT2 in Nieren männlicher Ratten sowie der starke Einfluss von Testosteron auf die Expression passen zu den Untersuchungsergebnissen dieser Arbeit. OCT2 konnte hier im Rattenhoden u.a. in den Leydig-Zellen, Hauptproduktionsstätte von Testosteron, nachgewiesen werden. Besonders deutlich war der Nachweis in den Leydig-Zellen immunfluoreszenzmikroskopisch.

Die ebenfalls zur *SLC22* (solute carrier) Familie gehörenden OCTN1-3, welche das Zwitterion Carnitin transportieren, konnten mithilfe von Western Blot Analyse auch im Hoden nachgewiesen werden. Dabei stellt Carnitin eine wichtige Energiequelle für Reifung, Beweglichkeit und Fertilität der Spermien dar (Xuan et al., 2003). Eine ähnliche Rolle könnte auch ACh spielen, welches von den OCTs transportiert wird. Im Rahmen dieser

Arbeit konnte beobachtet werden, dass OCT2 vor allem in den späten Keimzellstadien wie Pachytän-Spermatozyten und runden Spermatiden vorhanden ist.

Wessler & Kirkpatrick (2008) konnten nachweisen, dass Inhibitoren der organischen Kationentransporter die Freisetzung von ACh deutlich herabsetzten. Experimente an transfizierten Oozyten zeigten einen ACh-Transport über OCT1 und OCT2, nicht jedoch über OCT3 (Lips et al., 2005), was im Widerspruch zu Beobachtungen an der Plazenta steht. Dort ist OCT3 an der Freisetzung von ACh beteiligt (Wessler et al., 2001b). Scheinbar gibt es bei den einzelnen Subtypen gewebe- und zellspezifische Unterschiede. Durch die weite Verbreitung organischer Kationentransporter sind sie geeignet die Freisetzung von non-neuronalem ACh zu vermitteln (Wessler & Kirkpatrick, 2008).

4.4 Expression von Acetylcholin im Rahmen der experimentell ausgelösten Autoimmunorchitis - Problematik der Standardabweichung und Signifikanz

Ziel dieser Arbeit war, neben dem Nachweis der molekularen Komponenten des cholinergen Systems im unbehandelten Hoden der Ratte, Unterschiede in der Lokalisation und Expression im entzündeten Hoden zu untersuchen und aufzuzeigen. Von anderen entzündlichen Erkrankungen wie z.B. der atopischen Dermatitis ist bekannt, dass es in deren Rahmen zu einer erhöhten Ausschüttung von Acetylcholin kommt, welches für die Kardinalsymptome der Erkrankung verantwortlich ist.

Im unbehandelten Hoden der Ratte fand sich für das synthetisierende Enzym ChAT, den hochaffinen Cholintransporter ChT1, den organischen Kationentransporter OCT2 und die nAChR-Untereinheiten $\alpha 4$ und $\alpha 7$ eine deutliche Expression. Der Nachweis der ChAT, ChT1, VACHT und OCT2 mRNA Expression mittels RT-PCR-Analyse zeigte, wenn auch in unterschiedlichem Ausmaß, in Rattenhoden sowohl 50 als auch 80 Tage nach dem Auslösen einer Autoimmunorchitis eine Abnahme der Expression. Letztendlich ist dies aber nicht durch eine verminderte Expression im eigentlichen Sinn bedingt, sondern durch das Fehlen der die molekularen Komponenten exprimierenden Keimzellen. Aufgrund der Autoimmunorchitis kommt es zu einer Störung der Spermatogenese und einem daraus resultierenden Mangel an Keimzellen.

Quantitativ konnten keine Signifikanzen in der Abnahme der Expression zwischen unbehandelten und entzündeten Hoden nachgewiesen werden. Dies lässt sich auf die starken interindividuellen Unterschiede, erkennbar an den ausgeprägten Standardabweichungen, zurückführen. Auch wenn bei der Auswahl der Hoden darauf geachtet wurde, dass es sich um Tiere mit einer klinisch sichtbaren Autoimmunorchitis (u.a. mit deutlich reduziertem Hodenvolumen) handelte, scheinen nicht alle das gleiche Ausmaß einer Entzündungsreaktion mit dem damit verbundenen Verlust an Keimzellen aufzuweisen. Zudem konnten ChAT und ChT1, wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt, immunfluoreszenzmikroskopisch auch in Gefäßen und Lymphfollikeln vor allem in Hoden mit Autoimmunorchitis nachgewiesen werden. Dies kann ebenfalls den Nachweis der Komponenten beeinflussen. Mit einer größeren Zahl an Versuchstieren könnten diese interindividuellen Unterschiede ausgeglichen werden.

Bei den ohnehin schwach und nur in wenigen Zellen exprimierten Transportern VACHT (Pachytänspermatozyten, runde Spermatiden) und OCT3 (Leydig-Zellen, Spermatogonien) zeigte sich beim qualitativen Nachweis mittels RT-PCR-Analyse und Immunfluoreszenz eine weitere Abnahme der Expression. Somit war weder für VACHT in Orchitis 50 Tage und 80 Tage nach Behandlung noch für OCT3 80 Tage nach Behandlung ein positiver Nachweis mehr zu verzeichnen.

4.5 Vorkommen und Rolle von Acetylcholin in anderen inflammatorischen oder autoimmunologisch bedingten Erkrankungen

Als Modell zur Untersuchung des Vorkommens von Acetylcholin und dessen Rolle im Rahmen von inflammatorischen Erkrankungen dient u.a. die atopische Dermatitis. Dabei handelt es sich um eine Erkrankung, welche mit generalisiertem Juckreiz, Entzündung mit zellulärer Infiltration, Akanthose und Spongiose einhergeht. Vogelsang et al. (1995) und Heyer et al. (1997) konnten zeigen, dass Acetylcholin bei Patienten mit atopischer Dermatitis, im Gegensatz zu Gesunden, Juckreiz induziert und sehr wahrscheinlich für die Symptome verantwortlich ist. Menschliche Keratinozyten produzieren non-neuronales Acetylcholin, welches als lokales Signalmolekül fungiert (Wessler et al., 1998). Bei Untersuchungen an Patienten mit atopischer Dermatitis fanden sich in Hautbiopsien, vor

allem im Bereich der Epidermis und der oberen Dermis, 14-fach erhöhte Spiegel an Acetylcholin im Vergleich zu gesunden Probanden (Wessler et al., 2003b). Der effektive Einsatz von Medikamenten mit Atropin-ähnlichen Eigenschaften und Wirkung auf nikotinische Rezeptorkanäle in der Therapie des Juckreizes spricht ebenfalls für den Einfluss von Acetylcholin auf die Symptome (Wessler et al., 2003b). Acetylcholin führt zu Vasodilatation und beeinflusst Zell-Zell-Kontakte (Wessler et al., 1998, 1999), so dass erhöhte Acetylcholinspiegel zu einer gestörten Barrierefunktion und erhöhtem Blutfluss und somit zu Entzündung und Spongiose bei atopischer Dermatitis führen können (Wessler et al., 2003b).

Radosa et al. (2011) fanden im Rahmen von Untersuchungen an Patienten mit Psoriasis guttata heraus, dass auch hier das cholinerge System beteiligt ist. In den betroffenen Hautarealen befinden sich Rezeptoren und ACh nicht wie in gesunder Haut in den basalen Schichten, sondern oberhalb davon. Es konnte gezeigt werden, dass sich sowohl nikotinische ($\alpha 3$, $\alpha 5$, $\alpha 7$, $\alpha 9$, $\alpha 10$, $\beta 1$, $\beta 4$) als auch muskarinische (M_1 , M_{3-5}) AChR-Untereinheiten sowie AChE auf Mastzellen befinden. Überraschenderweise gelang der Nachweis der für die ACh-Synthese und –Speicherung notwendigen Elemente (ChAT, ChT1, VACHT) in Mastzellen nicht. Da ACh, Cholin und Nikotin zu einer Degranulation der Mastzellen führen, ist anzunehmen, dass Mastzellen lediglich Ziel parakriner und endokriner cholinerges Stimulation durch ACh sind. Vermutlich wird die Degranulation über die Ca^{2+} -permeablen AChR-Untereinheiten $\alpha 7$ und $\alpha 9/\alpha 10$ vermittelt (Radosa et al., 2011).

Des Weiteren wurde beobachtet, dass ein non-neuronales cholinerges System bei Tendopathie der Patellar- (Danielson et al., 2006, 2007a) und Achillessehne (Bjur et al., 2008) sowie im Rahmen von chronisch-entzündlichen Erkrankungen wie der rheumatoiden und Osteoarthritis (Grimsholm et al., 2008), aber auch der Colitis ulcerosa (Jönsson et al., 2007) existiert. Sowohl mithilfe der Immunhistochemie als auch der In-situ Hybridisierung konnte in Sehnen bzw. den Tenozyten, aber auch in Zellen der Dickdarmmukosa sowie in Fibroblasten- und Mononukleär-ähnlichen Zellen und Blutgefäßen ein non-neuronales cholinerges System nachgewiesen werden. Auffällig ist dabei, dass der Nachweis der für den ACh-Metabolismus wichtigen Enzyme und den mAChR M_2 besonders stark in pathologisch

verändertem Gewebe ist (Forsgren et al., 2009). Entzündlich bedingte proliferierende Prozesse und Gewebeumbau scheinen durch auto-/parakrine Effekte von ACh an muskarinischen Rezeptoren bedingt zu sein, ein anti-inflammatorischer Aspekt wird allerdings ebenfalls diskutiert (Forsgren et al., 2009). Durch die erhöhte Zahl an Tenozyten werden wiederum vermehrt ACh und andere Signalmoleküle produziert (Danielson et al., 2007b,c; Scott et al., 2008). Dadurch, dass bei Geweben wie Sehnen nur eine spärliche, bei Synovia sogar überhaupt keine cholinerge Innervation besteht, ist es wahrscheinlich, dass hier das lokal produzierte ACh direkt auf muskarinische Rezeptoren auf Tenozyten wirkt (Forsgren et al., 2009).

Das für den ACh-Metabolismus wichtige Enzym, ChAT, sowie der hochaffine Cholintransporter, ChT1, fanden sich auch im entzündlich veränderten Hodengewebe bei der experimentell ausgelösten Autoimmunorchitis. Immunfluoreszenzmikroskopisch zeigten vor allem Zellen in Granulomen eine starke Reaktion. Auch in Blutgefäßen – entzündlich verändertes Gewebe ist meist noch stärker vaskularisiert – konnte ChAT nachgewiesen werden.

Borovikova et al. (2000) prägten den Begriff des 'cholinergen anti-inflammatorischen Weges'. ACh, welches aus cholinergen Nerven als Antwort auf elektrische Stimulation des *N. vagus* freigesetzt wurde, hat demnach einen immunmodulierenden Effekt durch Inhibierung und damit Abschwächung der Wirkung von TNF α und anderer pro-inflammatorischer Zytokine wie IL-1 β , IL-6, IL-18. Das anti-inflammatorische Zytokin IL-10 bleibt unbeeinflusst. Möglicherweise stimuliert neuronal freigesetztes ACh wiederum die Freisetzung von non-neuronalem ACh (Wessler & Kirkpatrick, 2008). Nach Kawashima und Fujii (2003) treten jedoch über das non-neuronale cholinerge System ablaufende Prozesse unabhängig vom neuronalen System auf. Es ist wahrscheinlich, dass non-neuronales ACh die Immunantwort unabhängig von neuronaler Innervation beeinflusst, wie Neumann et al. (2007) mit Untersuchungen an peripheren Leukozyten zeigten.

Lymphozyten besitzen alle notwendigen Komponenten für ein unabhängiges, extraneuronales cholinerges System. Muskarinische und nikotinische ACh Rezeptoren wurden bereits auf Lymphozyten aus Thymus, Lymphknoten, Milz und peripherem Blut

nachgewiesen (Kawashima & Fujii, 2000). Sato et al. (1999) konnten mithilfe von RT-PCR in menschlichen Leukämie-Zelllinien und mononukleären Leukozyten zeigen, dass einige Lymphozyten sogar die Eigenschaft besitzen gleichzeitig muskarinische und nikotinische Rezeptoren zu exprimieren. Dadurch, dass die Rezeptorsubtypen M_1 , M_2 und M_3 zwischen Individuen und Zelllinien in ihrer Expression variieren, könnte es sein, dass diese genetisch determiniert ist und/oder durch Umwelteinflüsse wie Infektionen und physiologischen Stress reguliert wird (Kawashima & Fujii, 2000). In menschlichen Thymozyten konnten die nikotinischen Rezeptorsubtypen $\alpha 3$, $\alpha 5$ und $\beta 4$ (Mihovilovic & Roses, 1991, 1993) sowie $\alpha 1$ (Wakkach et al., 1996), in zirkulierenden menschlichen Lymphozyten $\alpha 3$ und $\alpha 4$ (Hiemke et al., 1996) nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu fanden sich in menschlichen mononukleären Leukozyten weder $\alpha 3$ - und $\alpha 4$ - noch $\beta 3$ - und $\beta 4$ -Subtypen. $\alpha 2$, $\alpha 5$ und $\alpha 7$ wurden exprimiert. Auch hier scheint es wie bei den muskarinischen Rezeptorsubtypen individuelle und speziesspezifische Unterschiede zu geben. Das hydrolysierende Enzym AChE ist ebenfalls in Lymphozyten vorhanden und seine Aktivität kann durch die Stimulation mit Phytohemagglutinin (PHA) erhöht werden (Paldi-Haris et al., 1990; Szelenyi et al., 1982, 1987), wie auch bei ChAT (Kawashima et al., 1997). Die immunologische Aktivierung von T-Lymphozyten scheint die cholinergen Komponenten zu verstärken.

ACh, welches von T-Lymphozyten synthetisiert und freigesetzt wird, fungiert als auto- und/oder parakriner immunmodulierender Faktor. ACh ist ubiquitär im Blut von Säugetieren vorhanden (Kawashima & Fujii, 2000). Der Nachweis von ChAT im buffy coat von Kaninchen lässt vermuten, dass ACh von Lymphozyten synthetisiert wird (Kajiyama et al., 1991) und das ChAT dabei auch vorrangig das synthetisierende Enzym ist. Fujii et al. (1995) wiesen sowohl ChAT mRNA als auch Protein in menschlichen Leukämie-T-Zelllinien nach. Calcineurin scheint dabei eine Rolle in der Regulierung der ChAT mRNA Transkription in mononukleären Leukozyten zu spielen. Die Tatsache, dass VACHT nicht in PHA-stimulierten mononukleären Leukozyten exprimiert wird, lässt vermuten, dass ACh in Lymphozyten nicht in Vesikeln gespeichert wird (Fujii et al., 1998).

Testikuläre Makrophagen besitzen mit dem synthetisierenden Enzym ChAT und dem hochaffinen Cholintransporter ChT1 zumindest einen Teil der Komponenten zur ACh-Synthese, Komponenten zur Speicherung und zum Transport wie VACHT oder OCT fehlen jedoch, ähnlich wie in Lymphozyten (Schirmer et al., 2011). Bezüglich der relativen mRNA Expression von nAChR-Untereinheiten weisen sie eine hohe Variabilität auf, hauptsächlich wurde mRNA von $\alpha 2$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 6$, $\alpha 7$, $\alpha 9$, $\alpha 10$ sowie $\beta 3$ exprimiert (Schirmer, Inauguraldissertation 2011). Interessanterweise fanden sich sowohl die Untereinheit nAChR $\alpha 4$ als auch $\alpha 7$, obwohl bisher die meisten Studien in Subpopulationen von Makrophagen nur das Vorliegen von nAChR $\alpha 4$ und das Fehlen von nAChR $\alpha 7$ beschreiben (Mikulski et al., 2010; Matsunaga et al., 2001; Galvis et al., 2006). Wang et al. (2003b) hingegen zeigten ebenfalls die mRNA Expression von nAChR $\alpha 7$ in von menschlichen Monozyten abgeleiteten Makrophagen und des weiteren die darüber inhibierte Freisetzung von TNF α .

Auch in der Expression von mRNA der MR-Untereinheiten zeigten testikuläre Makrophagen Variationen. Außer der M₁R-Untereinheit wurde keine der M₂R-M₅R konsequent exprimiert. Diese Beobachtungen bestätigen die von Kawashima & Fujii (2000) postulierte Hypothese der individuellen und speziesspezifischen Unterschiede, welche genetisch determiniert sein und/oder durch Umwelteinflüsse wie Infektionen und physiologischen Stress reguliert werden könnten.

Alle Komponenten des cholinergen Systems sind in den non-neuronalen Zellen des Hodens vorhanden. Inwiefern diese alle auch funktionsfähig sind, müssen weiterführende Experimente klären. Bisherige Beobachtungen aus anderen Organen/Organsystemen lassen vermuten, dass ACh Auswirkungen auf Zellproliferation, -differenzierung, Stoffwechsel und Motilität in testikulären Zellen hat. Die unmittelbare Nähe von Synthese- und Wirkort von ACh im Hoden begünstigt eine auto- oder parakrine Form der Regulation testikulärer Funktionen. Die Ergebnisse der durchgeführten Experimente sind ein eindeutiger Hinweis auf ein funktionsfähiges non-neuronales cholinerges System im Hoden und dessen möglichen Einfluss auf pathophysiologische Veränderungen (Schirmer et al., 2011).

5. Zusammenfassung

Acetylcholin ist seit langem als klassischer Neurotransmitter bekannt. Neben seiner Rolle im zentralen und peripheren Nervensystem wird ACh aber auch von einer Vielzahl non-neuronaler Zellen synthetisiert und freigesetzt. Deshalb wird vermutet, dass es eine auto-/parakrine Funktion in non-neuronalem Gewebe übernimmt. Der Nachweis von ACh im Hodenparenchym der Ratte (3.61 ± 1.32 pmol/mg Protein in immaturren Ratten, 3068.3 ± 764.94 pmol/mg Protein in adulten Ratten) in Kombination mit einer fehlenden Innervation deutet auf einen non-neuronalen Ursprung hin. Diese Tatsache sowie die erniedrigte Konzentration von ACh in experimenteller Autoimmunorchitis (EAO) gaben Anlass die Expression der ACh synthetisierenden und freisetzen Enzyme und Transporter in isolierten testikulären Zellen sowie EAO-Proben mithilfe von RT-PCR und Immunfluoreszenz zu untersuchen. Sowohl die Cholinacetyltransferase (ChAT) als auch der hochaffine Cholintransporter (ChT1) wurden besonders in Pachytän-Spermatozyten, runden Spermatiden und Residualkörperchen exprimiert. Interessanterweise konnte ChAT weder in frühen Keimzellstadien noch Spermatogonien und nur sehr schwach in interstitiellen Zellen nachgewiesen werden. ChT1 zeigte eine geringe Expression in Leydig-, Peritubulär-, Sertoli-Zellen und Spermatogonien, wohingegen Blutgefäße für ChAT immunfluoreszenzmikroskopisch stark angefärbt waren. Der vesikuläre Acetylcholin-Transporter (VACHT) wurde ausschließlich in isolierten Pachytän-Spermatozyten und runden Spermatiden gefunden. Immunfluoreszenzmikroskopisch zeigten nur Leydig-Zellen eine starke Anfärbung für die organischen Kationentransporter 2 und 3 (OCT), während die mRNA Expression in Pachytän-Spermatozyten, runden Spermatiden und Residualkörperchen (OCT2) sowie Spermatogonien (OCT3) vorhanden war. Die nikotinische Acetylcholinrezeptoruntereinheit $\alpha 7$ konnte nicht in runden Spermatiden und Residualkörperchen nachgewiesen werden. nAChR7 wird mäßig in Leydig-, Peritubulär-, Sertoli-Zellen, Spermatogonien und stärker in Pachytän-Spermatozyten exprimiert. Im Gegensatz zu Untersuchungsergebnissen in anderen chronisch entzündlichen Erkrankungen wie atopischer Dermatitis oder Psoriasis, konnte im Hoden von EAO Ratten eine Abnahme der Expression von ChAT, ChT1, VACHT und OCT2 beobachtet werden.

6. Summary

Acetylcholine has long been known as a classical neurotransmitter. Besides its role in the central and peripheral nervous system ACh is also synthesized and released by a large number of non-neuronal cells suggesting an autocrine/paracrine role in non-neuronal tissues. The presence of ACh in rat testicular parenchyma (3.61 ± 1.32 pmol/mg protein in immature rats, 3068.3 ± 764.94 pmol/mg protein in adult rats) with a concomitant lack of innervation indicates a non-neuronal origin. This together with a reduced concentration of ACh in experimental autoimmune orchitis (EAO) prompted us to investigate the expression profile of the ACh synthesizing and release machinery in isolated testicular cells and EAO samples using RT-PCR and immunofluorescence. Choline acetyltransferase (ChAT) and choline transporter (ChT1) showed high expression levels in pachytene spermatocytes, round spermatids and residual bodies. Interestingly, there was no evidence of ChAT in early germ cell stages, spermatogonia, and only faint expression of ChAT mRNA in interstitial cells. For ChT1, a constant low expression level was detected in Leydig cells, peritubular cells, Sertoli cells and spermatogonia, whereas blood vessels stained strongly positive for ChAT. The vesicular acetylcholine transporter (VAChT) was found exclusively in isolated pachytene spermatocytes and round spermatids. Immunofluorescence localization of organic cation transporter 2 and 3 (OCT) showed strong staining only in Leydig cells, whereas the mRNA expression levels were more pronounced in pachytene spermatocytes, round spermatids and residual bodies (OCT2) as well as in spermatogonia (OCT3). Alpha7, a nicotinic acetylcholine receptor (nAChR) subunit, was not detectable in round spermatids and residual bodies. Expression was moderate in Leydig cells, peritubular cells, Sertoli cells, spermatogonia and increased in pachytene spermatocytes. In contrast to findings in other chronic inflammatory diseases such as atopic dermatitis or psoriasis, a decrease of the expression of ChAT, ChT1, VAChT and OCT2 was observed in total testis extracts of EAO rats.

Literaturverzeichnis

- Albuquerque, E. X., Pereira, E. F., Alkondon, M. & Rogers, S. W. (2009). Mammalian nicotinic acetylcholine receptors: from structure to function. Physiol Rev 89: 73–120.
- Anakwe, O. O., Murphy, P. R. & Moger, W. H. (1985). Characterization of beta-adrenergic binding sites on rodent Leydig cells. Biol Reprod 33(4): 815-826.
- Anderson, D. C., King, S. C. & Parsons, S. M. (1983). Pharmacological characterization of the acetylcholine transport system in purified Torpedo electric organ synaptic vesicles. Mol Pharmacol 24(1): 48-54.
- Apparsundaram, S., Ferguson, S. M., George, A. L., Jr. & Blakely, R. D. (2000). Molecular cloning of a human hemicholinium-3-sensitive choline transporter. Biochem Biophys Res Commun 276(3): 862-867.
- Asaka, J., Terada, T., Okuda, M., Katsura, T. & Inui, K. (2006). Androgen receptor is responsible for rat organic cation transporter 2 gene regulation but not for rOCT1 and rOCT3. Pharm Res 23(4): 697-704.
- Atweh, S. F., Grayhack, J. J. & Richman, D. P. (1984). A cholinergic receptor site on murine lymphocytes with novel binding characteristics. Life Sci 35(24): 2459-2469.
- Batias, C., Defamie, N., Lablack, A., Thepot, D., Fenichel, P., Segretain, D. & Pointis, G. (1999). Modified expression of testicular gap-junction connexin 43 during normal spermatogenic cycle and in altered spermatogenesis. Cell Tissue Res 298(1): 113-121.
- Batias, C., Siffroi, J. P., Fenichel, P., Pointis, G. & Segretain, D. (2000). Connexin43 gene expression and regulation in the rodent seminiferous epithelium. J Histochem Cytochem 48(6): 793-805.
- Bell, C. (1972). Autonomic nervous control of reproduction: circulatory and other factors. Pharmacol Rev 24(4): 657-736.
- Bell, C. & McLean, J. R. (1973). The autonomic innervation of the rat testicular capsule. J Reprod Fertil 32(2): 253-258.
- Benishin, C. G. & Carroll, P. T. (1983). Multiple forms of choline-O-acetyltransferase in mouse and rat brain: solubilization and characterization. J Neurochem 41(4): 1030-1039.
- Bergmann, M. (2011). Spermatogenese. In: Krause, W., Weidner, W., Sperling, H., Diemer, T. (Hrsg.) Andrologie – Krankheiten der männlichen Geschlechtsorgane. 4.Auflage, Georg Thieme Verlag KG Stuttgart.
- Berrard, S., Varoqui, H., Cervini, R., Israël, M., Mallet, J. & Diebler, M. F. (1995). Coregulation of two embedded gene products, choline acetyltransferase and the vesicular acetylcholine transporter. J Neurochem 65(2): 939-942.
- Berse, B. & Blusztajn, J. K. (1995). Coordinated up-regulation of choline acetyltransferase and vesicular acetylcholine transporter gene expression by the retinoic acid receptor alpha, cAMP, and leukemia inhibitory factor/ciliary neurotrophic factor signaling pathways in a murine septal cell line. J Biol Chem 270(38): 22101-22104.
- Beyer, G. & Wense, U. T. (1936). Über den Nachweis von Hormonen in einzelligen Tieren: Cholin und Acetylcholin in Paramecium. Pflügers Arch. Gesamte Physiol. Menschen Tiere 237: 417-422.

- Bishop, M. R., Sastry, B. V., Schmidt, D. E. & Harbison, R. D. (1975). Spermic cholinergic system and occurrence of acetylcholine and other quaternary ammonium compounds in mammalian spermatozoa. Abstracts of papers for the Fourteenth Annual Meeting of the Society of Toxicology, pp. 65-66, Williamsburg, 1975; also Toxicol Appl Pharmacol 33: 733.
- Bishop, M. R., Sastry, B. V., Schmidt, D. E. & Harbison, R. D. (1976). Occurrence of choline acetyltransferase and acetylcholine and other quaternary ammonium compounds in mammalian spermatozoa. Biochem Pharmacol 25(14): 1617-1622.
- Bjur, D., Danielson, P., Alfredson, H. & Forsgren, S. (2008). Presence of a non-neuronal cholinergic system and occurrence of up- and down-regulation in expression of M2 muscarinic acetylcholine receptors: new aspects of importance regarding Achilles tendon tendinosis (tendinopathy). Cell Tissue Res 331(2): 385-400.
- Borovikova, L. V., Ivanova, S., Zhang, M., Yang, H., Botchkina, G. I., Watkins, L. R., Wang, H., Abumrad, N., Eaton, J. W. & Tracey, K. J. (2000). Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. Nature 405(6785): 458-462.
- Bose, M., Debnath, D., Chen, Y. & Bose, H. S. (2007). Folding, activity and import of steroidogenic acute regulatory protein into mitochondria changed by nicotine exposure. J Mol Endocrinol 39: 67-79.
- Bowman, H. M. & Hook, J. B. (1972). Sex differences in organic ion transport by rat kidney. Proc Soc Exp Biol Med 141(1): 258-262.
- Bray, C., Son, J. H., Kumar, P., Harris, J. D. & Meizel, S. (2002a). A role for the human sperm glycine receptor/Cl(-) channel in the acrosome reaction initiated by recombinant ZP3. Biol Reprod 66(1): 91-97.
- Bray, C., Son, J. H. & Meizel, S. (2002b). A nicotinic acetylcholine receptor is involved in the acrosome reaction of human sperm initiated by recombinant human ZP3. Biol Reprod 67(3): 782-788.
- Bray, C., Son, J. H., Kumar, P. & Meizel, S. (2005). Mice deficient in CHRNA7, a subunit of the nicotinic acetylcholine receptor, produce sperm with impaired motility. Biol Reprod 73(4): 807-814.
- Brehm, R., Zeiler, M., Rüttinger, C., Herde, K., Kibschull, M., Winterhager, E., Willecke, K., Guillou, F., Lécureuil, C., Steger, K., Konrad, L., Biermann, K., Failing, K. & Bergmann, M. (2007). A sertoli cell-specific knockout of connexin43 prevents initiation of spermatogenesis. Am J Pathol 171(1): 19-31.
- Brunner, F., Kuhberger, E., Brockmeier, D. & Kukovetz, W. R. (1990). Evidence for muscarinic receptors in endothelial cells from combined functional and binding studies. Eur J Pharmacol 187(2): 145-154.
- Bülbring, E., Lourie, E. M. & Pardoe, U. (1949). The presence of acetylcholine in *Trypanosoma rhodesiense* and its absence from *Plasmodium gallinaceum*. Br J Pharmacol Chemother 4(3): 290-294.
- Campos, M. B., Chiochio, S. R., Calandra, R. S. & Ritta, M. N. (1993). Effect of bilateral denervation of the immature rat testis on testicular gonadotropin receptors and in vitro androgen production. Neuroendocrinology 57(2): 189-194.
- Caulfield, M. P. (1993). Muscarinic receptors--characterization, coupling and function.

- Pharmacol Ther 58(3): 319-379.
- Caulfield, M. P. & Birdsall, N. J. (1998). International Union of Pharmacology. XVII. Classification of muscarinic acetylcholine receptors. Pharmacol Rev 50(2): 279-290.
- Cervini, R., Rocchi, M., DiDonato, S. & Finocchiaro, G. (1991). Isolation and sub-chromosomal localization of a DNA fragment of the human choline acetyltransferase gene. Neurosci Lett 132(2): 191-194.
- Cervini, R., Houhou, L., Pradat, P. F., Bejanin, S., Mallet, J. & Berrard, S. (1995). Specific vesicular acetylcholine transporter promoters lie within the first intron of the rat choline acetyltransferase gene. J Biol Chem 270(42): 24654-24657.
- Chiocchio, S. R., Suburo, A. M., Vladucic, E., Zhu, B. C., Charreau, E., Decima, E. E. & Tramezzani, J. H. (1999). Differential effects of superior and inferior spermatic nerves on testosterone secretion and spermatic blood flow in cats. Endocrinology 140(3): 1036-1043.
- Chow, S. H., Giglio, W., Anesetti, R., Ottenweller, J. E., Pogach, L. M. & Huang, H. F. (2000). The effects of testicular denervation on spermatogenesis in the Sprague-Dawley rat. Neuroendocrinology 72(1): 37-45.
- Clermont, Y. & Perey, B. (1957). Quantitative study of the cell population of the seminiferous tubules in immature rats. Am J Anat 100(2): 241-267.
- Cohen-Haguenauer, O., Brice, A., Berrard, S., Nguyen, V. C., Mallet, J. & Frézal, J. (1990). Localization of the choline acetyltransferase (CHAT) gene to human chromosome 10. Genomics 6(2): 374-378.
- Comline, R. S. (1946). Synthesis of acetylcholine by non-nervous tissue. J Physiol 105: 6.
- Dale, H. H. (1914). The action of certain esters and ethers of choline and their relation to muscarine. J Pharmacol Exp Ther 6: 147-190.
- Dale, H. H. & Dudley, H. W. (1929). The presence of histamine and acetylcholine in the spleen of the ox and the horse. J Physiol 68(2): 97-123.
- Danielson, P., Alfredson, H. & Forsgren, S. (2006). Immunohistochemical and histochemical findings favoring the occurrence of autocrine/paracrine as well as nerve-related cholinergic effects in chronic painful patellar tendon tendinosis. Microsc Res Tech 69(10): 808-819.
- Danielson, P., Alfredson, H. & Forsgren, S. (2007a). In situ hybridization studies confirming recent findings of the existence of a local nonneuronal catecholamine production in human patellar tendinosis. Microsc Res Tech 70(10): 908-911.
- Danielson, P., Alfredson, H. & Forsgren, S. (2007b). Studies on the importance of sympathetic innervation, adrenergic receptors, and a possible local catecholamine production in the development of patellar tendinopathy (tendinosis) in man. Microsc Res Tech 70(4): 310-324.
- Danielson, P., Andersson, G., Alfredson, H. & Forsgren, S. (2007c). Extensive expression of markers for acetylcholine synthesis and of M2 receptors in tenocytes in therapy-resistant chronic painful patellar tendon tendinosis - a pilot study. Life Sci 80(24-25): 2235-2238.
- Davidoff, M. S., Middendorff, R., Müller, D. & Holstein, A. F. (2009). The neuroendocrine Leydig cells and their stem cell progenitors, the pericytes. Adv Anat Embryol Cell Biol 205: 1-107.

- Day-Francesconi, M. & Casillas, E. R. (1982). The intracellular localization and properties of carnitine acetyltransferase from ram spermatozoa. Arch Biochem Biophys 215(1): 206-214.
- Defamie, N., Berthaut, I., Mograbi, B., Chevallier, D., Dadoune, J. P., Fénichel, P., Segretain, D. & Pointis, G. (2003). Impaired gap junction connexin43 in Sertoli cells of patients with secretory azoospermia: a marker of undifferentiated Sertoli cells. Lab Invest 83(3): 449-456.
- Doncel, G. F., Di Paola, J. A. & Lustig, L. (1989). Sequential study of the histopathology and cellular and humoral immune response during the development of an autoimmune orchitis in Wistar rats. Am J Reprod Immunol 20(2): 44-51.
- Du, M., Young, J., De Asis, M., Cipollone, J., Roskelley, C., Takai, Y., Nicholls, P. K., Stanton, P. G., Deng, W., Finlay, B. B. & Vogl, A. W. (2013). A novel subcellular machine contributes to basal junction remodeling in the seminiferous epithelium. Biol Reprod 88(3): 60 1-17.
- Dunant, Y. & Israël, M. (1995). Mediatophore and other presynaptic proteins. A cybernetic linking at the active zone. J Physiol Paris 89(3): 147-156.
- Dwivedi, C. & Long, N. J. (1989). Effect of cholinergic agents on human spermatozoa motility. Biochem Med Metab Biol 42(1): 66-70.
- Eiden, L. E. (1998). The cholinergic gene locus. J Neurochem 70(6): 2227-2240.
- el-Demiry, M. I., Hargreave, T. B., Busuttil, A., Elton, R., James, K. & Chisholm, G. D. (1987). Immunocompetent cells in human testis in health and disease. Fertil Steril 48(3): 470-479.
- Erickson, J. D., Varoqui, H., Schäfer, M. K., Modi, W., Diebler, M. F., Weihe, E., Rand, J., Eiden, L. E., Bonner, T. I. & Usdin, T. B. (1994). Functional identification of a vesicular acetylcholine transporter and its expression from a "cholinergic" gene locus. J Biol Chem 269(35): 21929-21932.
- Ewins, A. J. (1914). Acetylcholine, a new active principle of ergot. Biochem J 8(1): 44-49.
- Favaretto, A. L., Valenca, M. M., Picanco-Diniz, D. L. & Antunes-Rodrigues, J. A. (1993). Inhibitory role of cholinergic agonists on testosterone secretion by purified rat Leydig cells. Arch Int Physiol Biochim Biophys 101(6): 333-335.
- Fijak, M., Iosub, R., Schneider, E., Linder, M., Respondek, K., Klug, J. & Meinhardt, A. (2005). Identification of immunodominant autoantigens in rat autoimmune orchitis. J Pathol 207(2): 127-138.
- Filippini, A., Riccioli, A., Padula, F., Lauretti, P., D'Alessio, A., De Cesaris, P., Gandini, L., Lenzi, A. & Ziparo, E. (2001). Control and impairment of immune privilege in the testis and in semen. Hum Reprod Update 7(5): 444-449.
- Forsgren, S., Grimsholm, O., Jönsson, M., Alfredson, H. & Danielson, P. (2009). New insight into the non-neuronal cholinergic system via studies on chronically painful tendons and inflammatory situations. Life Sci 84(25-26): 865-870.
- Frankel, A. I. & Ryan, E. L. (1981). Testicular innervation is necessary for the response of plasma testosterone levels to acute stress. Biol Reprod 24(3): 491-495.
- Fritz, S., Föhr, K. J., Boddien, S., Berg, U., Brucker, C. & Mayerhofer, A. (1999). Functional and molecular characterization of a muscarinic receptor type and evidence for expression of choline-acetyltransferase and vesicular acetylcholine transporter in

- human granulosa-luteal cells. J Clin Endocrinol Metab 84(5): 1744-1750.
- Fritz, S., Wessler, I., Breitling, R., Rossmanith, W., Ojeda, S. R., Dissen, G. A., Amsterdam, A. & Mayerhofer, A. (2001). Expression of muscarinic receptor types in the primate ovary and evidence for nonneuronal acetylcholine synthesis. J Clin Endocrinol Metab 86(1): 349-354.
- Fritz, S., Kunz, L., Dimitrijevic, N., Grunert, R., Heiss, C. & Mayerhofer, A. (2002). Muscarinic receptors in human luteinized granulosa cells: activation blocks gap junctions and induces the transcription factor early growth response factor-1. J Clin Endocrinol Metab 87(3): 1362-1367.
- Fujii, T., Yamada, S., Misawa, H., Tajima, S., Fujimoto, K., Suzuki, T. & Kawashima, K. (1995). Expression of choline acetyltransferase mRNA and protein in T-lymphocytes. Proc Jpn Acad 71B: 231-235.
- Fujii, T., Yamada, S., Watanabe, Y., Misawa, H., Tajima, S., Fujimoto, K., Kasahara, T. & Kawashima, K. (1998). Induction of choline acetyltransferase mRNA in human mononuclear leukocytes stimulated by phytohemagglutinin, a T-cell activator. J Neuroimmunol 82(1): 101-107.
- Galvis, G., Lips, K. S. & Kummer, W. (2006). Expression of nicotinic acetylcholine receptors on murine alveolar macrophages. J Mol Neurosci 30(1-2): 107-108.
- Galzi, J. L. & Changeux, J. P. (1995). Neuronal nicotinic receptors: molecular organization and regulations. Neuropharmacology 34(6): 563-582.
- Gocze, P. M. & Freeman, D. A. (2000). Cytotoxic effects of cigarette smoke alkaloids inhibit the progesterone production and cell growth of cultured MA-10 Leydig tumor cells. Eur J Obstet Gynaecol Reprod Biol 93: 77-83.
- Gong, Y., Yang, Y., Li, H., Lu, Y., Wei, Q. & Liu, D. (2003). [Effect of removal of superior spermatic nerve on spermatogenesis]. Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban 34(3): 462-464.
- Gong, Y. G., Yang, Y. R., Zhang, W., Gu, M. & Yin, C. J. (2006). [Apoptosis in male germ cells induced by testicular denervation]. Zhonghua Nan Ke Xue 12(11): 968-973.
- Gong, Y. G., Wang, Y. Q., Gu, M., Feng, M. M., Zhang, W. & Ge, R. S. (2009). Deprivation of testicular innervation induces apoptosis of Leydig cells via caspase-8-dependent signaling: a novel survival pathway revealed. Biochem Biophys Res Commun 382(1): 165-170.
- Goodman, D. R. & Harbison, R. D. (1981). Characterization of enzymatic acetylcholine synthesis by mouse brain, rat sperm, and purified carnitine acetyltransferase. Biochem Pharmacol 30(12): 1521-1528.
- Goodman, D. R., Adatsi, F. K. & Harbison, R. D. (1984). Evidence for the extreme overestimation of choline acetyltransferase in human sperm, human seminal plasma and rat heart: a case of mistaking carnitine acetyltransferase for choline acetyltransferase. Chem Biol Interact 49(1-2): 39-53.
- Grando, S. A., Kist, D. A., Qi, M. & Dahl, M. V. (1993a). Human keratinocytes synthesize, secrete, and degrade acetylcholine. J Invest Dermatol 101(1): 32-36.
- Grando, S. A., Crosby, A. M., Zelickson, B. D. & Dahl, M. V. (1993b). Agarose gel keratinocyte outgrowth system as a model of skin re-epithelization: requirement of endogenous acetylcholine for outgrowth initiation. J Invest Dermatol 101(6): 804-810.

- Grando, S. A., Zelickson, B. D., Kist, D. A., Weinshenker, D., Bigliardi, P. L., Wendelschafer-Crabb, G., Kennedy, W. R. & Dahl, M. V. (1995). Keratinocyte muscarinic acetylcholine receptors: immunolocalization and partial characterization. J Invest Dermatol 104(1): 95-100.
- Grando, S. A., Horton, R. M., Mauro, T. M., Kist, D. A., Lee, T. X. & Dahl, M. V. (1996). Activation of keratinocyte nicotinic cholinergic receptors stimulates calcium influx and enhances cell differentiation. J Invest Dermatol 107(3): 412-418.
- Grimsholm, O., Rantapaa-Dahlqvist, S., Dalen, T. & Forsgren, S. (2008). Unexpected finding of a marked non-neuronal cholinergic system in human knee joint synovial tissue. Neurosci Lett 442(2): 128-133.
- Gründemann, D., Gorboulev, V., Gambaryan, S., Veyhl, M. & Koepsell, H. (1994). Drug excretion mediated by a new prototype of polyspecific transporter. Nature 372(6506): 549-552.
- Gründemann, D., Schechinger, B., Rappold, G. A. & Schömig, E. (1998). Molecular identification of the corticosterone-sensitive extraneuronal catecholamine transporter. Nat Neurosci 1(5): 349-351.
- Gudermann, T., Kalkbrenner, F. & Schultz, G. (1996). Diversity and selectivity of receptor-G protein interaction. Annu Rev Pharmacol Toxicol 36: 429-459.
- Guillaume, E., Pineau, C., Evrard, B., Dupaix, A., Moertz, E., Sanchez, J. C., Hochstrasser, D. F. & Jégou, B. (2001). Cellular distribution of translationally controlled tumor protein in rat and human testes. Proteomics 1(7): 880-889.
- Haberberger, R. V., Bodenbenner, M. & Kummer, W. (2000). Expression of the cholinergic gene locus in pulmonary arterial endothelial cells. Histochem Cell Biol 113(5): 379-387.
- Haga, T. (1971). Synthesis and release of (14 C)acetylcholine in synaptosomes. J Neurochem 18(6): 781-798.
- Haga, T. & Noda, H. (1973). Choline uptake systems of rat brain synaptosomes. Biochim Biophys Acta 291(2): 564-575.
- Hartmann, E. & Kilbinger, H. (1974). Occurrence of light-dependent acetylcholine concentrations in higher plants. Experientia 30(12): 1397-1398.
- Hayer-Zillgen, M., Brüss, M. & Bönisch, H. (2002). Expression and pharmacological profile of the human organic cation transporters hOCT1, hOCT2 and hOCT3. Br J Pharmacol 136(6): 829-836.
- Hedger, M. P. & Meinhardt, A. (2003). Cytokines and the immune-testicular axis. J Reprod Immunol 58(1): 1-26.
- Herber, D. L., Severance, E. G., Cuevas, J., Morgan, D. & Gordon, M. N. (2004). Biochemical and histochemical evidence of nonspecific binding of alpha7nAChR antibodies to mouse brain tissue. J Histochem Cytochem 52(10): 1367-1376.
- Heyer, G., Vogelsang, M. & Hornstein, O. P. (1997). Acetylcholine is an inducer of itching in patients with atopic eczema. J Dermatol 24(10): 621-625.
- Hiemke, C., Stolp, M., Reuss, S., Wevers, A., Reinhardt, S., Maelicke, A., Schlegel, S. & Schröder, H. (1996). Expression of alpha subunit genes of nicotinic acetylcholine receptors in human lymphocytes. Neurosci Lett 214(2-3): 171-174.

- Hodson, N. P. (1970). The nerves of the testis, epididymis and scrotum. In: Johnson, A. D., Gomes, W. R., Vandermark, N. L. (eds.), The Testis. Vol 1. New York: Academic Press.
- Holdcraft, R. W. & Braun, R. E. (2004). Hormonal regulation of spermatogenesis. Int J Androl 27(6): 335-342.
- Holstein, A. F. (2003). Männliche Geschlechtsorgane. In: Benninghoff, Drenckhahn D. (Hrsg.) Anatomie - Makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie, Zellbiologie. Band 1. 16.Auflage, Urban & Fischer Verlag München, Jena.
- Ibanez, C. F., Ernfors, P. & Persson, H. (1991a). Developmental and regional expression of choline acetyltransferase mRNA in the rat central nervous system. J Neurosci Res 29(2): 163-171.
- Ibanez, C. F., Peltö-Huikko, M., Söder, O., Ritzén, E. M., Hersh, L. B., Hökfelt, T. & Persson, H. (1991b). Expression of choline acetyltransferase mRNA in spermatogenic cells results in an accumulation of the enzyme in the postacrosomal region of mature spermatozoa. Proc Natl Acad Sci U S A 88(9): 3676-3680.
- Iosub, I. R. Pathomechanism of testicular inflammation in rat involves activation of proteinase activated receptor 2. Inauguraldissertation. Justus-Liebig-Universität Gießen 2005.
- Iosub, R., Klug, J., Fijak, M., Schneider, E., Fröhlich, S., Blumbach, K., Wennemuth, G., Sommerhoff, C. P., Steinhoff, M. & Meinhardt, A. (2006). Development of testicular inflammation in the rat involves activation of proteinase-activated receptor-2. J Pathol 208(5): 686-698.
- Jaffe, M. J. (1970). Evidence for the regulation of phytochrome-mediated processes in bean roots by the neurohumor, acetylcholine. Plant Physiol 46(6): 768-777.
- Jahn, R. & Südhof, T. C. (1994). Synaptic vesicles and exocytosis. Annu Rev Neurosci 17: 219-246.
- Johnson, L. (1994). A new approach to study the architectural arrangement of spermatogenic stages revealed little evidence of a partial wave along the length of human seminiferous tubules. J Androl 15(5): 435-441.
- Johnson, L., McKenzie, K.S. & Snell, J.R. (1996). Partial wave in human seminiferous tubules appears to be a random occurrence. Tissue Cell 28(2): 127-136.
- Jönsson, M., Norrgård, O. & Forsgren, S. (2007). Presence of a marked nonneuronal cholinergic system in human colon: study of normal colon and colon in ulcerative colitis. Inflamm Bowel Dis 13(11): 1347-1356.
- Jungnickel, M. K., Marrero, H., Birnbaumer, L., Lemos, J. R. & Florman, H. M. (2001). Trp2 regulates entry of Ca²⁺ into mouse sperm triggered by egg ZP3. Nat Cell Biol 3(5): 499-502.
- Kajiyama, K., Suzuki, T., Fujimoto, K. & Kawashima, K. (1991). Determination of acetylcholine content and choline acetyltransferase activity in rabbit blood cells obtained from buffy coat layer. Jpn J Pharmacol 55(suppl.), 194 P.
- Kawashima, K., Fujii, T., Misawa, H., Yamada, S., Tajima, S., Suzuki, T., Fujimoto, K. & Kasahara, T. (1997). Presence of acetylcholine in the blood and its production by choline acetyltransferase in lymphocytes. In: Teelken, A. & Korf, J. (eds.),

- Neurochemistry: Cellular, Molecular, and Clinical Aspects (pp. 813–819). New York and London: Plenum.
- Kawashima, K. & Fujii, T. (2000). Extraneuronal cholinergic system in lymphocytes. Pharmacol Ther 86(1): 29-48.
- Kawashima, K. & Fujii, T. (2003). The lymphocytic cholinergic system and its contribution to the regulation of immune activity. Life Sci 74(6): 675-696.
- Kekuda, R., Prasad, P. D., Wu, X., Wang, H., Fei, Y. J., Leibach, F. H. & Ganapathy, V. (1998). Cloning and functional characterization of a potential-sensitive, polyspecific organic cation transporter (OCT3) most abundantly expressed in placenta. J Biol Chem 273(26): 15971-15979.
- Kengaku, M., Misawa, H. & Deguchi, T. (1993). Multiple mRNA species of choline acetyltransferase from rat spinal cord. Brain Res Mol Brain Res 18(1-2): 71-76.
- Kirkpatrick, C. J., Bittinger, F., Unger, R. E., Kriegsmann, J., Kilbinger, H. & Wessler, I. (2001). The non-neuronal cholinergic system in the endothelium: evidence and possible pathobiological significance. Jpn J Pharmacol 85(1): 24-28.
- Klapproth, H., Reinheimer, T., Metzen, J., Münch, M., Bittinger, F., Kirkpatrick, C. J., Höhle, K. D., Schemann, M., Racké, K. & Wessler, I. (1997). Non-neuronal acetylcholine, a signalling molecule synthesized by surface cells of rat and man. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 355(4): 515-523.
- Koepsell, H., Schmitt, B. M. & Gorboulev, V. (2003). Organic cation transporters. Rev Physiol Biochem Pharmacol 150: 36-90.
- Koepsell, H., Lips, K. & Volk, C. (2007). Polyspecific organic cation transporters: structure, function, physiological roles, and biopharmaceutical implications. Pharm Res 24(7): 1227-1251.
- Kordik, P., Bulbring, E. & Burn, J. H. (1952). Ciliary movement and acetylcholine. Br J Pharmacol Chemother 7(1): 67-79.
- Krysko, D. V., Leybaert, L., Vandenabeele, P. & D'Herde, K. (2005). Gap junctions and the propagation of cell survival and cell death signals. Apoptosis 10(3): 459-469.
- Kuhar, M. J. & Murrin, L. C. (1978). Sodium-dependent, high affinity choline uptake. J Neurochem 30(1): 15-21.
- Kummer, W., Lips, K. S. & Pfeil, U. (2008). The epithelial cholinergic system of the airways. Histochem Cell Biol 130(2): 219-234.
- Kuntz, A. & Morris, R. E., Jr. (1946). Components and distribution of the spermatic nerves and the nerves of the vas deferens. J Comp Neurol 85: 33-44.
- Laird, D. W. (2006). Life cycle of connexins in health and disease. Biochem J 394(Pt 3): 527-543.
- Lamano Carvalho, T. L., Hodson, N. P., Blank, M. A., Watson, P. F., Mulderry, P. K., Bishop, A. E., Gu, J., Bloom, S. R. & Polak, J. M. (1986). Occurrence, distribution and origin of peptide-containing nerves of guinea pig and rat male genitalia and the effects of denervation on sperm characteristics. J Anat 149: 121-141.
- Lee, H. J. & Chang, C. (2003). Recent advances in androgen receptor action. Cell Mol Life Sci 60(8): 1613-1622.
- Lentz, T. L. (1966). Histochemical localization of neurohumors in a sponge. J Exp Zool 162: 171-180.

- Lips, K. S., Pfeil, U., Haberberger, R. V. & Kummer, W. (2002). Localisation of the high-affinity choline transporter-1 in the rat skeletal motor unit. Cell Tissue Res 307(3): 275-280.
- Lips, K. S., Volk, C., Schmitt, B. M., Pfeil, U., Arndt, P., Miska, D., Ermert, L., Kummer, W. & Koepsell, H. (2005). Polyspecific cation transporters mediate luminal release of acetylcholine from bronchial epithelium. Am J Respir Cell Mol Biol 33(1): 79-88.
- Loewi, O. (1921). Über humorale Übertragbarkeit der Herznervenwirkung. Pflügers Arch 189: 239-242.
- Loewi, O. & Navratil, E. (1926). Über humorale Übertragbarkeit der Herznervenwirkung: X. Mitteilung. Über das Schicksal des Vagusstoff. Pflügers Arch. Gesamte Physiol 214: 678-688.
- Lönnerberg, P. & Ibanez, C. F. (1999). Novel, testis-specific mRNA transcripts encoding N-terminally truncated choline acetyltransferase. Mol Reprod Dev 53(3): 274-281.
- Malo, M. & Israël, M. (2003). Expression of the acetylcholine release mechanism in various cells and reconstruction of the release mechanism in non-releasing cells. Life Sci 72(18-19): 2029-2038.
- Marshall, I. G. & Parsons, S. M. (1987). The vesicular acetylcholine transport system. Trends Neurosci 10: 174-177.
- Marubio, L. M., del Mar Arroyo-Jimenez, M., Cordero-Erausquin, M., Léna, C., Le Novère, N., de Kerchove d'Exaerde, A., Huchet, M., Damaj, M. I. & Changeux, J. P. (1999). Reduced antinociception in mice lacking neuronal nicotinic receptor subunits. Nature 398: 805-810.
- Matsunaga, K., Klein, T. W., Friedman, H. & Yamamoto, Y. (2001). Involvement of nicotinic acetylcholine receptors in suppression of antimicrobial activity and cytokine responses of alveolar macrophages to Legionella pneumophila infection by nicotine. J Immunol 167(11): 6518-6524.
- Matsuo, A., Bellier, J. P., Hisano, T., Aimi, Y., Yasuhara, O., Tooyama, I., Saito, N. & Kimura, H. (2005). Rat choline acetyltransferase of the peripheral type differs from that of the common type in intracellular translocation. Neurochem Int 46(5): 423-433.
- Mayerhofer, A., Steger, R. W., Gow, G. & Bartke, A. (1992). Catecholamines stimulate testicular testosterone release of the immature golden hamster via interaction with alpha- and beta-adrenergic receptors. Acta Endocrinol (Copenh) 127(6): 526-530.
- Mayerhofer, A., Danilchik, M., Pau, K. Y., Lara, H. E., Russell, L. D. & Ojeda, S. R. (1996). Testis of prepubertal rhesus monkeys receives a dual catecholaminergic input provided by the extrinsic innervation and an intragonadal source of catecholamines. Biol Reprod 55(3): 509-518.
- Mayerhofer, A. & Fritz, S. (2002). Ovarian acetylcholine and muscarinic receptors: hints of a novel intrinsic ovarian regulatory system. Microsc Res Tech 59(6): 503-508.
- Mayerhofer, A., Dimitrijevic, N. & Kunz, L. (2003). The expression and biological role of the non-neuronal cholinergic system in the ovary. Life Sci 72(18-19): 2039-2045.
- Mayerhofer, A. & Kunz, L. (2005). A non-neuronal cholinergic system of the ovarian follicle. Ann Anat 187(5-6): 521-528.
- Mayerhofer, A., Kunz, L., Krieger, A., Proskocil, B., Spindel, E., Amsterdam, A., Dissen, G. A., Ojeda, S. R. & Wessler, I. (2006). FSH regulates acetylcholine production by

- ovarian granulosa cells. Reprod Biol Endocrinol 4: 37.
- McGrady, A. V. & Nelson, L. (1976). Cholinergic effects on bull and chimpanzee sperm motility. Biol Reprod 15(2): 248-253.
- Meinhardt, A. & Schuppe, H.-Ch. (2003). Immunologie des Hodens - Balance zwischen Immunprivileg und Entzündung. Reproduktionsmedizin 2003 19: 257-266.
- Meinhardt, A. & Hedger, M. P. (2011). Immunological, paracrine and endocrine aspects of testicular immune privilege. Mol Cell Endocrinol 335(1): 60-68.
- Meizel, S. (2004). The sperm, a neuron with a tail: 'neuronal' receptors in mammalian sperm. Biol Rev Camb Philos Soc 79(4): 713-732.
- Meizel, S. & Son, J. H. (2005). Studies of sperm from mutant mice suggesting that two neurotransmitter receptors are important to the zona pellucida-initiated acrosome reaction. Mol Reprod Dev 72(2): 250-258.
- Melendrez, C. S. & Meizel, S. (1996). Immunochemical identification of the glycine receptor/Cl-channel in porcine sperm. Biochem Biophys Res Commun 223(3): 675-678.
- Mihovilovic, M. & Roses, A. D. (1991). Expression of mRNAs in human thymus coding for the alpha 3 subunit of a neuronal acetylcholine receptor. Exp Neurol 111(2): 175-180.
- Mihovilovic, M. & Roses, A. D. (1993). Expression of alpha-3, alpha-5, and beta-4 neuronal acetylcholine receptor subunit transcripts in normal and myasthenia gravis thymus. Identification of thymocytes expressing the alpha-3 transcripts. J Immunol 151(11): 6517-6524.
- Mikulski, Z., Hartmann, P., Jositsch, G., Zaslona, Z., Lips, K. S., Pfeil, U., Kurzen, H., Lohmeyer, J., Clauss, W. G., Grau, V., Fronius, M. & Kummer, W. (2010). Nicotinic receptors on rat alveolar macrophages dampen ATP-induced increase in cytosolic calcium concentration. Respir Res 11: 133.
- Millar, N. S. (2003). Assembly and subunit diversity of nicotinic acetylcholine receptors. Biochem Soc Trans 31(Pt 4): 869-874.
- Misawa, H., Ishii, K. & Deguchi, T. (1992). Gene expression of mouse choline acetyltransferase. Alternative splicing and identification of a highly active promoter region. J Biol Chem 267(28): 20392-20399.
- Moser, N., Mechawar, N., Jones, I., Gochberg-Sarver, A., Orr-Urtreger, A., Plomann, M., Salas, R., Molles, B., Marubio, L., Roth, U., Maskos, U., Winzer-Serhan, U., Bourgeois, J. P., Le Sourd, A. M., De Biasi, M., Schröder, H., Lindstrom, J., Maelicke, A., Changeux, J. P. & Wevers, A. (2007). Evaluating the suitability of nicotinic acetylcholine receptor antibodies for standard immunodetection procedures. J Neurochem 102(2): 479-492.
- Münch M., Reinheimer T., Racké K. & Wessler I. (1997). Effect of oral dexamethasone on non-neuronal acetylcholine in rat. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 355 (Suppl.): R24.
- Nachmansohn, D. & Machado, A. L. (1943). The formation of acetylcholine: a new enzyme choline acetylase. J Neurophysiol 6: 397-403.
- Nelson, L. (1972). Neurochemical control of Arbacia sperm motility. Exp Cell Res 74(1): 269-274.
- Nelson, L. (1976). Alpha-bungarotoxin binding by cell membranes. Blockage of sperm cell

- motility. Exp Cell Res 101(2): 221-224.
- Neumann, S., Razen, M., Habermehl, P., Meyer, C. U., Zepp, F., Kirkpatrick, C. J. & Wessler, I. (2007). The non-neuronal cholinergic system in peripheral blood cells: effects of nicotinic and muscarinic receptor antagonists on phagocytosis, respiratory burst and migration. Life Sci 80(24-25): 2361-2364.
- Ogawa, H., Fujii, T., Watanabe, Y. & Kawashima, K. (2003). Expression of multiple mRNA species for choline acetyltransferase in human T-lymphocytes. Life Sci 72(18-19): 2127-2130.
- Okuda, M., Saito, H., Urakami, Y., Takano, M. & Inui, K. (1996). cDNA cloning and functional expression of a novel rat kidney organic cation transporter, OCT2. Biochem Biophys Res Commun 224(2): 500-507.
- Okuda, T., Haga, T., Kanai, Y., Endou, H., Ishihara, T. & Katsura, I. (2000). Identification and characterization of the high-affinity choline transporter. Nat Neurosci 3(2): 120-125.
- Okuda, T. & Haga, T. (2003). High-affinity choline transporter. Neurochem Res 28(3-4): 483-488.
- O'Toole, C. M., Arnoult, C., Darszon, A., Steinhardt, R. A. & Florman, H. M. (2000). Ca^{2+} entry through store-operated channels in mouse sperm is initiated by egg ZP3 and drives the acrosome reaction. Mol Biol Cell 11(5): 1571-1584.
- Paldi-Haris, P., Szelenyi, J. G., Nguyen, T. H. & Hollan, S. R. (1990). Changes in the expression of the cholinergic structures of human T lymphocytes due to maturation and stimulation. Thymus 16(2): 119-122.
- Parsons, S. M. (2000). Transport mechanisms in acetylcholine and monoamine storage. Faseb J 14(15): 2423-2434.
- Parvinen, M. (1982). Regulation of the seminiferous epithelium. Endocr Rev 3(4): 404-417.
- Pfeil, U., Vollerthun, R., Kummer, W. & Lips, K. S. (2004). Expression of the cholinergic gene locus in the rat placenta. Histochem Cell Biol 122(2): 121-130.
- Placzek, R., Krassnigg, F. & Schill, W. B. (1988). Effect of ace-inhibitors, calmodulin antagonists, acetylcholine receptor blocking, and alpha receptor blocking agents on motility of human sperm. Arch Androl 21(1): 1-10.
- Pointis, G., Fiorini, C., Defamie, N. & Segretain, D. (2005). Gap junctional communication in the male reproductive system. Biochim Biophys Acta 1719(1-2): 102-116.
- Pointis, G. & Segretain, D. (2005). Role of connexin-based gap junction channels in testis. Trends Endocrinol Metab 16(7): 300-306.
- Prince, F. P. (1992). Ultrastructural evidence of indirect and direct autonomic innervation of human Leydig cells: comparison of neonatal, childhood and pubertal ages. Cell Tissue Res 269(3): 383-390.
- Properzi, G., Cordeschi, G. & Francavilla, S. (1992). Postnatal development and distribution of peptide-containing nerves in the genital system of the male rat. An immunohistochemical study. Histochemistry 97(1): 61-68.
- Racké, K., Juergens, U. R. & Matthiesen, S. (2006). Control by cholinergic mechanisms. Eur J Pharmacol 533(1-3): 57-68.
- Radosa, J., Dyck, W., Goerdt, S. & Kurzen, H. (2011). The cholinergic system in guttate psoriasis with special reference to mast cells. Exp Dermatol 20(8): 677-679.
- Reinheimer, T., Münch, M., Bittinger, F., Racké, K., Kirkpatrick, C. J. & Wessler, I. (1998a).

- Glucocorticoids mediate reduction of epithelial acetylcholine content in the airways of rats and humans. Eur J Pharmacol 349(2-3): 277-284.
- Reinheimer, T., Vogel, P., Bittinger, F., Kirkpatrick, C. J., Saloga, J., Knop, J. & Wessler, I. (1998b). Up-regulation of non-neuronal acetylcholine in patients with atopic dermatitis. J Invest Dermatol Suppl 110, 556.
- Rey, R. (2003). Regulation of spermatogenesis. Endocr Dev 5: 38-55.
- Risley, M. S., Tan, I. P., Roy, C. & Sáez, J. C. (1992). Cell-, age- and stage-dependent distribution of connexin43 gap junctions in testes. J Cell Sci 103 (Pt 1): 81-96.
- Risley, M. S. (2000). Connexin gene expression in seminiferous tubules of the Sprague-Dawley rat. Biol Reprod 62(3): 748-754.
- Rossier, J. (1977). Acetyl-coenzyme A and coenzyme A analogues. Their effects on rat brain choline acetyltransferase. Biochem J 165(2): 321-326.
- Russell, L. (1977). Movement of spermatocytes from the basal to the adluminal compartment of the rat testis. Am J Anat 148(3): 313-328.
- Russell, L. D. (1979). Observations on the inter-relationships of Sertoli cells at the level of the blood- testis barrier: evidence for formation and resorption of Sertoli-Sertoli tubulobulbar complexes during the spermatogenic cycle of the rat. Am J Anat 155(2): 259-279.
- Russell, L. D. (1993). Normal development of the testis. In: Mohr, U., Dungworth, D. L., Capen, C. C. (eds.) Pathophysiology of the aging rat. ILSI Press, Washington DC, 395-405.
- Santamaría, L., Reoyo, A., Regadera, J. & Paniagua, R. (1990). Histochemistry and ultrastructure of nerve fibres and contractile cells in the tunica albuginea of the rat testis. Acta Anat (Basel) 139(2): 126-133.
- Sanyal, R. K. & Khanna, S. K. (1971). Action of cholinergic drugs on motility of spermatozoa. Fertil Steril 22(6): 356-359.
- Sargent, P. B. (1993). The diversity of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. Annu Rev Neurosci 16: 403-443.
- Sarkar, G. & Sommer, S. S. (1990a). Shedding light on PCR contamination. Nature 343(6253): 27.
- Sarkar, G. & Sommer, S. S. (1990b). More light on PCR contamination. Nature 347(6291): 340-341.
- Sarkar, G. & Sommer, S. S. (1991). Parameters affecting susceptibility of PCR contamination to UV inactivation. Biotechniques 10(5): 590-594.
- Sarkar, G. & Sommer, S. S. (1993). Removal of DNA contamination in polymerase chain reaction reagents by ultraviolet irradiation. Methods Enzymol 218: 381-388.
- Sastry, B. V. & Sadavongvivad, C. (1979). Cholinergic systems in non-nervous tissues. Pharmacol Rev 30: 65-132.
- Sato, K. Z., Fujii, T., Watanabe, Y., Yamada, S., Ando, T., Kazuko, F. & Kawashima, K. (1999). Diversity of mRNA expression for muscarinic acetylcholine receptor subtypes and neuronal nicotinic acetylcholine receptor subunits in human mononuclear leukocytes and leukemic cell lines. Neurosci Lett 266(1): 17-20.
- Sato, Y., Son, J. H. & Meizel, S. (2000a). The mouse sperm glycine receptor/chloride channel: cellular localization and involvement in the acrosome reaction initiated by glycine. I

- Androl 21(1): 99-106.
- Sato, Y., Son, J. H., Tucker, R. P. & Meizel, S. (2000b). The zona pellucida-initiated acrosome reaction: defect due to mutations in the sperm glycine receptor/Cl(-) channel. Dev Biol 227(1): 211-218.
- Saunders, P. T. (2003). Germ cell-somatic cell interactions during spermatogenesis. Reprod Suppl 61: 91-101.
- Saxena, P. R., Tangri, K. K. & Bhargava, K. P. (1966). Identification of acetylcholine, histamine, and 5-hydroxytryptamine in *Girardinia heterophylla* (Decne.). Can J Physiol Pharmacol 44(4): 621-627.
- Schirmer, S. Expression profile of components of the acetylcholine-system in rat testicular tissue and function in non-germ cell populations. Inauguraldissertation. Justus-Liebig-Universität Gießen 2011.
- Schirmer, S. U., Eckhardt, I., Lau, H., Klein, J., DeGraaf, Y. C., Lips, K. S., Pineau, C., Gibbins, I. L., Kummer, W., Meinhardt, A. & Haberberger, R. V. (2011). The cholinergic system in rat testis is of non-neuronal origin. Reproduction 142(1): 157-166.
- Scott, A. (1962). Acetylcholine in normal and diseased skin. Br J Dermatol 74: 317-322.
- Scott, A., Alfredson, H. & Forsgren, S. (2008). VGluT2 expression in painful Achilles and patellar tendinosis: evidence of local glutamate release by tenocytes. J Orthop Res 26(5): 685-692.
- Setchell, B. P., Maddocks, S. & Brooks, D. E. (1994). Anatomy, vasculature, innervation, and fluids of the male reproductive tract. In: Knobil, E. & Neill, J. D., eds. The Physiology of Reproduction. Vol 1, 2nd ed. New York: Raven Press; 1063-1175.
- Slitt, A. L., Cherrington, N. J., Hartley, D. P., Leazer, T. M. & Klaassen, C. D. (2002). Tissue distribution and renal developmental changes in rat organic cation transporter mRNA levels. Drug Metab Dispos 30(2): 212-219.
- Sliwa, L. (1995). Chemotaction of mouse spermatozoa induced by certain hormones. Arch Androl 35(2): 105-110.
- Sommersberg, B., Bulling, A., Salzer, U., Fröhlich, U., Garfield, R. E., Amsterdam, A. & Mayerhofer, A. (2000). Gap junction communication and connexin 43 gene expression in a rat granulosa cell line: regulation by follicle-stimulating hormone. Biol Reprod 63(6): 1661-1668.
- Son, J. H. & Meizel, S. (2003). Evidence suggesting that the mouse sperm acrosome reaction initiated by the zona pellucida involves an $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor. Biol Reprod 68(4): 1348-1353.
- Sosa, Z. Y., Palmada, M. N., Fóscolo, M. R., Capani, F., Conill, A. & Cavicchia, J. C. (2009). Administration of noradrenaline in the autonomic ganglia modifies the testosterone release from the testis using an ex vivo system. Int J Androl 32(4): 391-398.
- Steger, K., Tetens, F. & Bergmann, M. (1999). Expression of connexin 43 in human testis. Histochem Cell Biol 112(3): 215-220.
- Strauss, W. L., Kemper, R. R., Jayakar, P., Kong, C. F., Hersh, L. B., Hilt, D. C. & Rabin, M. (1991). Human choline acetyltransferase gene maps to region 10q11-q22.2 by in situ hybridization. Genomics 9(2): 396-398.
- Suárez-Garnacho, S. & Vega, J. A. (1990). [Microscopic innervation of the spermatic ducts

- and testicle. IV. Testis]. Arch Esp Urol 43(5): 443-447.
- Suarez, S. S. & Ho, H. C. (2003). Hyperactivated motility in sperm. Reprod Domest Anim 38(2): 119-124.
- Szelenyi, J. G., Bartha, E. & Hollan, S. R. (1982). Acetylcholinesterase activity of lymphocytes: an enzyme characteristic of T-cells. Br J Haematol 50(2): 241-245.
- Szelenyi, J., Paldi-Haris, P. & Hollan, S. (1987). Changes in the cholinergic system of lymphocytes due to mitogenic stimulation. Immunol Lett 16(1): 49-54.
- Tooyama, I. & Kimura, H. (2000). A protein encoded by an alternative splice variant of choline acetyltransferase mRNA is localized preferentially in peripheral nerve cells and fibers. J Chem Neuroanat 17(4): 217-226.
- Tuček, S. (1982). The synthesis of acetylcholine in skeletal muscles of the rat. J Physiol 322: 53-69.
- Tung, K. S. & Teuscher, C. (1995). Mechanisms of autoimmune disease in the testis and ovary. Hum Reprod Update 1(1): 35-50.
- Urakami, Y., Nakamura, N., Takahashi, K., Okuda, M., Saito, H., Hashimoto, Y. & Inui, K. (1999). Gender differences in expression of organic cation transporter OCT2 in rat kidney. FEBS Lett 461(3): 339-342.
- Urakami, Y., Okuda, M., Saito, H. & Inui, K. (2000). Hormonal regulation of organic cation transporter OCT2 expression in rat kidney. FEBS Lett 473(2): 173-176.
- Viegas-Pequignot, E., Berrard, S., Brice, A., Apiou, F. & Mallet, J. (1991). Localization of a 900-bp-long fragment of the human choline acetyltransferase gene to 10q11.2 by nonradioactive in situ hybridization. Genomics 9(1): 210-212.
- Vogelsang, M., Heyer, G. & Hornstein, O. P. (1995). Acetylcholine induces different cutaneous sensations in atopic and non-atopic subjects. Acta Derm Venereol 75(6): 434-436.
- Waites, G. M. & Gladwell, R. T. (1982). Physiological significance of fluid secretion in the testis and blood-testis barrier. Physiol Rev 62(2): 624-671.
- Wakkach, A., Guyon, T., Bruand, C., Tzartos, S., Cohen-Kaminsky, S. & Berrih-Aknin, S. (1996). Expression of acetylcholine receptor genes in human thymic epithelial cells: implications for myasthenia gravis. J Immunol 157(8): 3752-3760.
- Wang, N., Orr-Urtreger, A., Chapman, J., Rabinowitz, R., Nachman, R. & Korczyn, A. D. (2002). Autonomic function in mice lacking alpha5 neuronal nicotinic acetylcholine receptor subunit. J Physiol 542: 347-354.
- Wang, N., Orr-Urtreger, A., Chapman, J., Rabinowitz, R. & Korczyn, A. D. (2003a). Deficiency of nicotinic acetylcholine receptor beta 4 subunit causes autonomic cardiac and intestinal dysfunction. Mol Pharmacol 63: 574-580.
- Wang, H., Yu, M., Ochani, M., Amella, C. A., Tanovic, M., Susarla, S., Li, J. H., Wang, H., Yang, H., Ulloa, L., Al-Abed, Y., Czura, C. J. & Tracey, K. J. (2003b). Nicotinic acetylcholine receptor alpha7 subunit is an essential regulator of inflammation. Nature 421(6921): 384-388.
- Wanner, A., Salathe, M. & O'Riordan, T. G. (1996). Mucociliary clearance in the airways. Am J Respir Crit Care Med 154(6 Pt 1): 1868-1902.
- Weidner, W., Krause, W. & Ludwig, M. (1999). Relevance of male accessory gland infection for subsequent fertility with special focus on prostatitis. Hum Reprod Update 5(5):

421-432.

- Weinbauer, G. F., Gromoll, J., Simoni, M., Nieschlag, E. (2000). Physiologie der Hodenfunktion. In: Nieschlag, E., Behre, H. M. (Hrsg.) Andrologie - Grundlagen und Klinik der reproduktiven Gesundheit des Mannes. 2. Auflage, Springer Verlag Berlin.
- Weinbauer, G. F., Luetjens, C. M., Simoni, M., Nieschlag, E. (2009). Physiologie der Hodenfunktion. In: Nieschlag, E., Behre, H.M., Nieschlag, S. (Hrsg.) Andrologie - Grundlagen und Klinik der reproduktiven Gesundheit des Mannes. 3. Auflage, Springer Verlag Berlin.
- Welsch, U. (2006). Sobotta Lehrbuch Histologie : Zytologie, Histologie, mikroskopische Anatomie. München [u.a.], Urban & Fischer in Elsevier.
- Wessler, I., Kirkpatrick, C. J. & Racké, K. (1998). Non-neuronal acetylcholine, a locally acting molecule, widely distributed in biological systems: expression and function in humans. Pharmacol Ther 77(1): 59-79.
- Wessler, I., Kirkpatrick, C. J. & Racké, K. (1999). The cholinergic 'pitfall': acetylcholine, a universal cell molecule in biological systems, including humans. Clin Exp Pharmacol Physiol 26(3): 198-205.
- Wessler, I., Kilbinger, H., Bittinger, F. & Kirkpatrick, C. J. (2001a). The biological role of non-neuronal acetylcholine in plants and humans. Jpn J Pharmacol 85(1): 2-10.
- Wessler, I., Roth, E., Deutsch, C., Brockerhoff, P., Bittinger, F., Kirkpatrick, C. J. & Kilbinger, H. (2001b). Release of non-neuronal acetylcholine from the isolated human placenta is mediated by organic cation transporters. Br J Pharmacol 134(5): 951-956.
- Wessler, I., Kilbinger, H., Bittinger, F., Unger, R. & Kirkpatrick, C. J. (2003a). The non-neuronal cholinergic system in humans: expression, function and pathophysiology. Life Sci 72(18-19): 2055-2061.
- Wessler, I., Reinheimer, T., Kilbinger, H., Bittinger, F., Kirkpatrick, C. J., Saloga, J. & Knop, J. (2003b). Increased acetylcholine levels in skin biopsies of patients with atopic dermatitis. Life Sci 72(18-19): 2169-2172.
- Wessler, I. & Kirkpatrick, C. J. (2008). Acetylcholine beyond neurons: the non-neuronal cholinergic system in humans. Br J Pharmacol 154(8): 1558-1571.
- Whittaker, V. P. (1963). Identification of acetylcholine and related esters of biological origin. In: Eichler, O., Farah, A. & Koelle, G. B. (eds.). Handbuch der Experimentellen Pharmakologie, Bd. 15, pp. 1-39, Springer, Berlin Heidelberg, New York.
- Willecke, K., Eiberger, J., Degen, J., Eckardt, D., Romualdi, A., Guldenagel, M., Deutsch, U. & Sohl, G. (2002). Structural and functional diversity of connexin genes in the mouse and human genome. Biol Chem 383(5): 725-737.
- Wong, L. B., Miller, I. F. & Yeates, D. B. (1988a). Regulation of ciliary beat frequency by autonomic mechanisms: in vitro. J Appl Physiol 65(4): 1895-1901.
- Wong, L. B., Miller, I. F. & Yeates, D. B. (1988b). Stimulation of ciliary beat frequency by autonomic agonists: in vivo. J Appl Physiol 65(2): 971-981.
- Wrobel, K. H. & Brandl, B. (1998). The autonomous innervation of the porcine testis in the period from birth to adulthood. Ann Anat 180(2): 145-156.
- Wrobel, K. H., Brandl, B., Feldmeier, F., Ghali, D. N. & Moustafa, K. (1998). Die Verteilung autonomer Nerven im Hoden von Mensch und Säugetieren (Forschungsbericht der Universität Regensburg).

- Wrobel, K. H. & Moustafa, M. N. (2000). On the innervation of the donkey testis. Ann Anat 182(1): 13-22.
- Wrobel, K. H. & Schenk, E. (2003). Immunohistochemical investigations of the autonomous innervation of the cervine testis. Ann Anat 185(6): 493-506.
- Wu, D. & Hersh, L. B. (1994). Choline acetyltransferase: celebrating its fiftieth year. I Neurochem 62(5): 1653-1663.
- Xuan, W., Lamhonwah, A. M., Librach, C., Jarvi, K. & Tein, I. (2003). Characterization of organic cation/carnitine transporter family in human sperm. Biochem Biophys Res Commun 306(1): 121-128.
- Yan, H. H., Mruk, D. D., Wong, E. W., Lee, W. M. & Cheng, C. Y. (2008). An autocrine axis in the testis that coordinates spermiation and blood-testis barrier restructuring during spermatogenesis. Proc Natl Acad Sci U S A 105(26): 8950-8955.
- Yule, T. D. & Tung, K. S. (1993). Experimental autoimmune orchitis induced by testis and sperm antigen-specific T cell clones: an important pathogenic cytokine is tumor necrosis factor. Endocrinology 133(3): 1098-1107.
- Zhou, Z. Z., Zheng, Y., Steenstra, R., Hickey, W. F. & Teuscher, C. (1989). Actively-induced experimental allergic orchitis (EAO) in Lewis/NCR rats: sequential histo- and immunopathologic analysis. Autoimmunity 3(2): 125-134.
- Zhu, B. C., Chiochio, S. R., Suburo, A. M. & Tramezzani, J. H. (1995). Monoaminergic and peptidergic contributions of the superior and the inferior spermatic nerves to the innervation of the testis in the rat. J Androl 16(3): 248-258.
- Zhu, L. J. & Altmann, S. W. (2005). mRNA and 18S-RNA coapplication-reverse transcription for quantitative gene expression analysis. Anal Biochem 345(1): 102-109.

Anhang

A. Danksagungen

Ich danke Prof. Dr. Andreas Meinhardt für die Bereitstellung des Themas, die Möglichkeit zur Mitarbeit in seiner Arbeitsgruppe, die Betreuung meiner Arbeit, sowie seine tatkräftige Unterstützung bei der Lokalisation der cholinergen Komponenten im Rahmen der Immunfluoreszenzauswertung.

Des Weiteren gilt ein großer Dank PD Dr. Katrin Lips, welche in hohem Maße zum cholinergen Teil dieser Arbeit mit ihrem Fachwissen, aber auch der Bereitstellung diverser Materialien beitrug. Ganz herzlichen Dank, liebe Katrin, für die moralische und fachkompetente Unterstützung und die gute Zusammenarbeit!

Dr. Jörg Klug sei gedankt für die Hilfe bei der Erarbeitung neuer Methoden und die Unterstützung bei der Konzeption meiner Experimente mit seinem enormen Wissen.

Ein Dankeschön geht an Prof. Dr. Jochen Klein und Helene Lau vom pharmakologischen Institut für Naturwissenschaftler der Goethe-Universität Frankfurt für die von ihnen durchgeführten Acetylcholin-Messungen in Rattenhoden.

Danke an Dr. Sudhanshu Bhushan für die Einarbeitung in die ersten Experimente zum non-neuronalen cholinergen System und die Reverse Transkription der Rennes-Zellen-RNA.

Besonders möchte ich mich bei Suada Fröhlich für die Einführung in die molekularbiologischen Arbeitstechniken bedanken. Du warst mir immer mit Rat und Tat zur Seite gestanden und deine wunderbar erfrischende Art hat oft Sonne in den Tag gebracht!

Vielen Dank auch an Eva Schneider und Dr. Monika Fijak, welche immer für Fragen offen gewesen sind und durch ihre fachliche Kompetenz wertvolle Tipps gegeben haben. Ein besonderer Dank auch für die Bereitstellung der Adjuvans- und EAO-Proben!

Ein herzliches Dankeschön an Martin Bodenbenner und Tamara Papadakis für die Einarbeitung in die immunfluoreszenzmikroskopische Methodik und die Bereitstellung ihrer Labormaterialien, sowie an Dr. Uwe Pfeil für seine Unterstützung bei der quantitativen RealTime PCR und an alle anderen Mitglieder der AG Kardiopulmonale Neurobiologie und

deren Leitung Prof. Dr. Wolfgang Kummer für die Hilfe bei Fragen und die zur Verfügung gestellten Materialien und Geräte.

Ich danke außerdem Dariusz Zakrzewicz, früher Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Oliver Eickelberg, für seine Hilfe bei der Durchführung der Densitometrie zur Quantifizierung der mRNA Expression in verschiedenen isolierten Zellen des Hodens der Ratte, Anca Nenicu aus der Arbeitsgruppe Medizinische Zellbiologie unter der Leitung von Prof. Dr. Eveline Baumgart-Vogt und Dr. Mariusz Kowalewski aus dem Fachbereich Veterinärmedizin der JLU für die freundliche Weitergabe der Leydig-Zellmarker.

Mein größter Dank gilt meiner Mutter, meinem Mann Benjamin, meiner Familie und all meinen Freunden, insbesondere Beccy und Chrissie. Ohne eure Liebe, Unterstützung und den Glauben an mich wäre ich niemals da, wo ich heute bin!

B. Eigene Veröffentlichungen

Poster

I **Eckhardt**, K S Lips, I Wessler, C Pineau, W Kummer, A Meinhardt. Expression analysis of components of the cholinergic system in isolated rat testicular cells. Molecular Andrology, Gießen, Germany, 8.-10.Mai 2009.

Publikation

SU Schirmer, I **Eckhardt**, H Lau, J Klein, Y C DeGraaf, K S Lips, C Pineau, J L Gibbins, W Kummer, A Meinhardt, R V Haberberger. The cholinergic system in rat testis is of non-neuronal origin. Reproduction. 2011 Jul;142(1):157-66. Epub 2011 Apr 11.

C. Ehrenwörtliche Erklärung

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Nürnberg, den 20.12.2012

Iris V. B. Eckhardt



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-6083-1



9 78 3 835 19 60 83 1